

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Farmacología



TESIS DOCTORAL

**Búsqueda de compuestos antiamiloidogénicos con potencial
terapéutico en la enfermedad de Alzheimer**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Karim Lizeth Jiménez Aliaga

Directores

Paloma Bermejo Bescós
Sagrario Martín-Aragón Álvarez
Juana Benedí González

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacología



**BÚSQUEDA DE COMPUESTOS ANTIAMILOIDOGÉNICOS CON
POTENCIAL TERAPÉUTICO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Memoria para optar al Grado de Doctor

Presentada por

KARIM LIZETH JIMÉNEZ ALIAGA

Directoras:

Dra. Paloma Bermejo Bescós

Dra. Sagrario Martín-Aragón Álvarez

Dra. Juana Benedí González

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacología



**BÚSQUEDA DE COMPUESTOS ANTIAMILOIDOGÉNICOS CON
POTENCIAL TERAPÉUTICO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Memoria presentada por

KARIM LIZETH JIMÉNEZ ALIAGA

Para la obtención del grado de doctor

VºBº Directoras

Fdo.:
Dra. Paloma Bermejo Bescós

Fdo.:
Dra. Sagrario Martín-Aragón Álvarez

Fdo.:
Dra. Juana Benedí González

Madrid, 2014

PALOMA BERMEJO BESCÓS, SAGRARIO MARTÍN-ARAGÓN ÁLVAREZ y JUANA BENEDÍ GONZÁLEZ, Profesoras del Departamento de Farmacología (Farmacognosia y Farmacología Experimental) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN: que el presente Trabajo titulado: "Búsqueda de compuestos antiamiloidogénicos con potencial terapéutico en la enfermedad de Alzheimer", llevado a cabo por Dña. KARIM LIZETH JIMÉNEZ ALIAGA, ha sido realizado bajo nuestra dirección.

Creemos que el mencionado Trabajo reúne las características necesarias para ser defendido ante un Tribunal para la obtención del grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firmamos el presente certificado en Madrid a 2 de Diciembre de 2014.

Fdo.:

Dra. Paloma Bermejo Bescós

Fdo.:

Dra. Sagrario Martín-Aragón Álvarez

Fdo.:

Dra. Juana Benedí González

DEDICATORIA

A Dios por bendecir mis pasos. A mis abuelitos por cuidarme siempre desde el cielo. A mis padres Norma y Gil Ernesto por ser mi principal fortaleza para alcanzar mis metas. A mis hermanos Ronald y Lucila por el inmenso cariño que siempre me brindan, a mis sobrinos Valeria, Salvador y Favio por ser el rayito de luz que ilumina de esperanza nuestras vidas. A Camilo por ser mi amor incondicional.

AGRADECIMIENTOS

“Caminante no hay camino el camino se hace al andar”

Antonio Machado

Fueron cerca de 5 años de camino recorrido lleno de experiencias estupendas en un país diferente que me dio la oportunidad de conocer a personas increíbles que hicieron posible que la estancia en Madrid principalmente en el departamento de Farmacología sea maravillosa.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su colaboración han hecho posible la realización de esta tesis.

A Juana Benedí por haber hecho posible mi estancia en la UCM desde los trámites burocráticos, que no fueron pocos, por su asesoría constante y por haberme brindado todas las facilidades para la realización de la tesis, principalmente por su amistad, muchísimas gracias.

A Paloma y Sagrario por cultivar en mí la investigación científica en todo el sentido de la palabra, por su asesoría en tiempo real, por sus sabios consejos, por enseñarme las cosas de una manera tan sencilla, por la confianza depositada en mí, por los cafecitos mañaneros acompañados de charlas tan amenas, por ser más que tutoras mis amigas y consejeras tanto en lo profesional como en lo personal, no puedo dejar de mencionar toda la paciencia y comprensión que tuvieron conmigo en la etapa de redacción de la tesis, muchas gracias, sois las mejores.

A mis compañeras de laboratorio, Andrea por compartir largas horas de trabajo juntas apoyando el hombro para sacar adelante los experimentos que muchas veces no salían, por las saliditas nocturnas que contribuyeron a fortalecer nuestra amistad. A Vanne, mi peque por el enorme cariño, por tu fortaleza para hacer las cosas lo mejor posible, por tu espíritu de superación tan contagiante, sobre todo por tu amistad, nunca cambies.

A mis amigos del Master principalmente a Pilar por su invaluable amistad, confianza y apoyo brindado en un país tan lejano al mío, por sus consejos y por enseñarme a minimizar los problemas cuando yo me ahogaba en un vaso de agua, gracias lindis.

A mis compañeros tesisistas que compartían conmigo el sentimiento de querer terminar la tesis lo más pronto posible, pero por amor a la investigación siempre se podía enriquecer el trabajo, Laura, Miguel, Patricia, Elena, Natalia, Irene, Luis, Guillermo, María, Anita..., por compartir materiales, equipos, reactivos, por las charlas intermedias tan divertidas a la espera de la campana, potenciómetro, lector de geles, fluorímetro, etc, etc.

A mis amigos del Instituto Pluridisciplinar de Cartografía Cerebral por brindarme todas las herramientas necesarias para el manejo de los ratones y todas las técnicas de neuroimagen especialmente a Mercedes y Luis por su amistad y por el apoyo brindado para la consecución de este trabajo. A Pablo, Rubén y Anita por toda vuestra ayuda, por las charlas y risas que hicieron más amena la estancia.

A nuestros amigos extranjeros visitantes, por permitirme conocer una cultura diferente a la mía, Ahmed, Jazmin, Paulina, Mustafá, Judith, Sandra, y por estar en un país lejano de alguna manera compartíamos ese sentimiento de añoro al terruño y a la familia.

A toda la gente del departamento que siempre se ha portado genial conmigo, a la directora y a todos y cada uno de los docentes y administrativos, muchas gracias.

A la Fundación Folch, por el financiamiento conferido que hizo posible la culminación de la tesis. Agradezco en forma especial a Carlos por todas las facilidades brindadas.

¡Gracias a todos por dejar que formara parte de vuestras vidas!

El trabajo aquí presentado ha sido realizado con cargo a los proyectos de investigación siguientes:

- "Búsqueda de compuestos antiamiloidogénicos con potencial terapéutico en la enfermedad de Alzheimer" Financiado por la Fundación Mutua Madrileña (2007-2010).
- "Nuevos método catalíticos de síntesis estereoselectiva basados en el empleo de ácidos borónicos. Evaluación de la actividad neuroprotectora de los productos resultantes" Financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación España. Plan Nacional I+D+I (2010-2012).

Y gracias a las becas predoctorales

- Programa de becas de alto nivel académico de la Unión Europea para América Latina. (Programa Alβan) Finaciado por la Asociación del grupo Santander. Universidad do Porto. Noviembre 2007- Abril 2010.
- Becas Complutense predoctorales en España. Financiado por la Fundación Folch. Abril 2010-2012.

ÍNDICE

	Pág.
ABREVIATURAS	1
SUMMARY	3
INTRODUCCIÓN	8
1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: MARCO HISTÓRICO, SINTOMATOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA	9
2. FACTORES DE RIESGO:	10
2.1. Factores genéticos.....	10
2. 2. Factores no genéticos.....	10
3. PROTEÍNA PRECURSORA DE β-AMILOIDE (APP):	11
3.1. Funciones.....	12
3.2. Procesamiento de APP:.....	13
- Vía no amiloidogénica.....	13
- Vía amiloidogénica.....	14
4. HIPÓTESIS DE LA CASCADA DE βA:	16
4.1. Toxicidad del péptido β A.....	18
4.2. Implicación del β A oligomérico.....	19
4.3. Papel patológico del β A intracelular.....	19
- β A en la hiperfosforilacion de Tau.....	20
- β A y estrés oxidativo.....	22
4.4. β A y respuesta inflamatoria.....	27
5. MECANISMOS MOLECULARES DE MUERTE NEURONAL EN LA EA:	30
5.1. Apoptosis.....	30
5.2. Autofagia.....	32
6. MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE:	33
6.1 Sistemas enzimáticos:	34
- Superóxido dismutasa.....	35
- Catalasa.....	35
- Glutation peroxidasa.....	36
- Glutation reductasa.....	37
6.2. Sistemas no enzimáticos:	37
- Glutation.....	37
6.3. Sistemas de degradación de proteínas y EA:	38
- Proteasoma 20S.....	38
- Proteasoma 26S.....	40
7. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD:	41
7.1. Neuroimagen.....	41
7.2. Búsqueda de biomarcadores	43
8. MODELOS DE ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD	43
9. TRATAMIENTO ACTUAL DE LA ENFERMEDAD	45

10. PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS.....	46
10.1 Flavonoides:	47
- Clasificación.....	47
- Efectos farmacológicos.....	48
- Metabolismo.....	53
MATERIALES Y METODOS.....	54
1. ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	55
1.1. Preparación de los flavonoides.....	55
1.2. Inhibición de la actividad β -secretasa.....	55
1.3. Inhibición de la actividad γ -secretasa.....	55
1.4. Inhibición de la actividad acetilcolinesterasa (AChE)	56
1.5. Estudio de la inhibición de la agregación y desagregación del péptido β A:.....	56
- Preparación del péptido β A.....	56
- Estudio de la agregación del péptido β A ₂₅₋₃₅ por microscopía electrónica.....	57
- Cuantificación de la agregación del β A ₂₅₋₃₅ por espectroscopia de fluorescencia en fase estacionaria.....	57
- Cuantificación de la agregación del β A ₂₅₋₃₅ por espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo.....	57
2. CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR DE NEUROBLASTOMA HUMANO APPswe.....	58
2.1. Viabilidad celular. Reducción del bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT)	58
2.2. Actividad lactato deshidrogenasa (LDH)	59
2.3. Esquema general de tratamiento de la línea celular APPswe.....	59
2.4. Inhibición de la generación de radicales libres inducida por H ₂ O ₂	59
2.5. Actividad enzimática de caspasas 3 y 6	59
2.6. Actividad del proteasoma 20S y 26S.....	60
3. MODELO ANIMAL DE ALZHEIMER EXPERIMENTAL.....	61
3.1. Genotipado de los ratones transgénicos TgAPP.....	61
3.2. Protocolo de administración de los flavonoides a los animales.....	62
3.3. Captación de ¹⁸ F-Fluorodeoxiglucosa (¹⁸ [F]-FDG) por Tomografía por Emisión de Positrones (PET) <i>in vivo</i>	63
3.4. Captación de ¹⁸ [F]-FDG <i>ex vivo</i> mediante autorradiografía:	64
- Obtención de imágenes 3D.....	64
- Análisis.....	64
3.5. Expresión de los receptores ionotrópicos de glutamato:	65
- Autorradiografía ³ H-AMPA.....	65
- Autorradiografía ³ H-MK801	65
- Autorradiografía ³ H-Kainato.....	65
3.6. Tinción con Fluoro-Jade C.....	65
3.7. Tinción de los agregados de β A utilizando la Tioflavina T.....	66
4. DETERMINACIONES REALIZADAS EN CÉLULAS APPswe Y EN CORTEZA E HIPOCAMPO DE RATONES TgAPP.....	67
4.1. Glutation.....	67
4.2. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)	68
4.3. Actividad enzimática de las principales enzimas antioxidantes:	68

- Superóxido Dismutasa.....	68
- Catalasa.....	69
- Glutation Reductasa.....	69
- Glutation Peroxidasa.....	70
4.4. Niveles de proteínas mediante western blot:	71
- Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS (PAGE-SDS)	71
- Western blot.....	72
4.5. Expresión génica por PCR en tiempo real:	72
- Extracción y purificación del ARN _{total}	72
- Síntesis de ADN complementario (ADNc)	74
- PCR a tiempo real.....	74
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	76
 <u>ESTUDIO <i>IN VITRO</i> DE LA ACTIVIDAD ANTIAMILOIDOGÉNICA Y ANTIOXIDANTE DE LOS FLAVONOIDES</u>	
1. OBJETIVOS DEL ESTUDIO <i>IN VITRO</i>	78
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	81
2.1. Actividad β -secretasa.....	82
2.2. Actividad γ secretasa.....	83
2.3. Actividad acetilcolinesterasa (AChE)	84
2.4. Agregación del βA_{25-35}	85
- Inhibición de la agregación por microscopía electrónica.....	86
- Cuantificación de la agregación por espectroscopia de fluorescencia estacionaria.....	87
- Cuantificación de la agregación por espectroscopia de fluorescencia de fase resuelta.....	90
2.5. Viabilidad celular.....	93
2.6. Generación de radicales libres inducida por peróxido de hidrógeno.....	93
3. CONCLUSIONES DEL ESTUDIO <i>IN VITRO</i>	97
 <u>ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES NEUROPROTECTORAS DE QUERCETINA Y RUTINA EN LA LÍNEA CELULAR TRANSGÉNICA APP_{swe}</u>	
1. OBJETIVOS DEL ESTUDIO EN LA LÍNEA CELULAR TRANSGÉNICA APP _{swe}	100
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	103
2.1. Glutation y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	104
2.2. Enzimas antioxidantes: actividad enzimática, niveles de proteína y expresión.....	105
2.3. Actividad enzimática del proteasoma 20S y 26S. Niveles y expresión de PARP-1.....	107
2.4. Procesamiento de APP.....	110
2.5. Actividad enzimática y expresión génica de Caspasa 3 y 6.....	113
3. CONCLUSIONES DEL ESTUDIO EN LA LÍNEA CELULAR TRANSGÉNICA APP _{swe}	115
 <u>ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIAMILOIDOGÉNICA Y NEUROPROTECTORA DE QUERCETINA Y RUTINA EN EL MODELO DE RATÓN TgAPP</u>	

1. OBJETIVOS DEL ESTUDIO EN EL MODELO DE RATÓN TgAPP.....	118
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	120
2.1. Evaluación de la actividad metabólica cerebral mediante PET en ratones macho de 28 semanas de edad.....	121
2.2. Obtención de imágenes 3D por autorradiografía utilizando ¹⁸ [F]-FDG en ratones macho de 45 semanas de edad tratados con quercetina y rutina.....	123
2.3. Expresión de receptores ionotrópicos de glutamato en ratones macho de 45 semanas de edad tratados con quercetina y rutina.....	125
2.4. Evaluación de la neurodegeneración (tinción marcaje con Fluoro-Jade C) y de la morfología nuclear de neuronas de hipocampo (contratinción con DAPI)....	128
2.5. Glutation.....	129
2.6. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)	130
2.7. Actividad enzimática y expresión de enzimas antioxidantes.....	131
2.8. Procesamiento APP.....	133
2.9. Expresión de Caspasas 3 y 6.....	135
2.10. Marcadores de inflamación.....	137
2.11. Efecto de rutina sobre la agregación del péptido β A en ratones TgAPP de 16 meses de edad	140
3. CONCLUSIONES DEL ESTUDIO EN EL MODELO DE RATÓN TgAPP.....	142
<u>CONCLUSIONES FINALES</u>	144
<u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	147

ABREVIATURAS

β A:	β amiloide
β A ₁₋₄₀ :	β amiloide de 40 aminoácidos
β A ₁₋₄₂ :	β amiloide de 42 aminoácidos
β A ₂₅₋₃₅ :	β amiloide que contiene desde el aminoácido 25 hasta el 35
α -APPs:	Ectodominio amino-terminal del APP soluble liberado por α -secretasa
β -APPs:	Ectodominio amino-terminal del APP soluble liberado por β -secretasa
¹¹ C-PiB:	Compuesto de Pittsburg
¹⁸ [F]-FDG:	¹⁸ F-Fluorodeoxiglucosa
AChE:	Acetilcolinesterasa
AChEI:	Inhibidores de la acetilcolinesterasa
ADAM:	Familia de las desintegrinas y metaloproteasas
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AICD:	Dominio intracelular del APP
Akt:	Proteína quinasa B
AMPA:	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato
ApoE4:	Apolipoproteína E alelo 4
APP:	Proteína precursora de β -amiloide
APP-C83:	Secuencia de 83 residuos aminoácidos anclada al extremo carboxi-terminal
APP-C99:	Secuencia de 99 residuos aminoácidos anclada al extremo carboxi-terminal
APPswe:	Proteína precursora de β A que contiene la mutación sueca
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
ATP:	Adenosin trifosfato
BACE:	β -secretasa también llamada Asp2 o memapsina
BHE:	Barrera hematoencefálica
CaMKII:	Quinasa dependiente de calcio/calmodulina II
CAT:	Catalasa
COX-2:	Ciclooxigenasa 2
Cu,Zn-SOD:	Superóxido dismutasa citosólica cobre, zinc-dependiente o SOD1
CuBD:	Dominio de unión a cobre
CYP:	Citocromos P450
DCL:	Deterioro cognitivo leve
EA:	Enfermedad de Alzheimer
ECE-1:	Enzima convertidora de endotelina 1
EH:	Enfermedad de Huntington
eNOS:	Óxido nítrico sintasa endotelial
EP:	Enfermedad de Parkinson
RNS:	Especies reactivas de nitrógeno
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
GABA:	Ácido gamma-aminobutírico
Gly-P:	Glicoproteína P
GPx:	Glutation peroxidasa
GR:	Glutation reductasa
GSH:	Glutation reducido
GSSG:	Glutation oxidado
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrógeno
HNE:	Aldehído-4-hidroxinonenal

IFN- γ :	Interferón γ
IL-1:	Interleucina 1
iNOS:	Óxido nítrico sintasa inducible
IP3:	Inositol trifosfato
KPI:	Proteasa inhibidora de serina de tipo Kunitz
LCR:	Líquido ceforraquídeo
LDH:	Lactato deshidrogenasa
LTP:	Potenciales de larga duración
MAPK:	Proteína quinasas activadas por mitógenos
MDA:	Malondialdehído
Mn-SOD:	Superóxido dismutasa mitocondrial o SOD2
NF- κ B:	Factor nuclear de transcripción kappa B
NMDA:	N-Metil D-Aspartato
nNOS:	Óxido nítrico sintasa neuronal
NOS:	Óxido nítrico sintasa
Notch:	Familia de receptores que son críticos para el desarrollo embrionario
NO:	Óxido nítrico
ONF:	Ovillos neurofibrilares
ONOO-:	Anión peroxinitrito
PARP-1:	Poli(ADP-ribosa) polimerasa-1
PEN2:	Presenilina 2
PET:	Tomografía por emisión de positrones
PHF:	Filamentos helicoidales apareados
PI3K:	Fosfatidilinositol-3 quinasa
PKA:	Proteína quinasa A
PKC:	Proteína quinasa C
PP2A:	Proteína fosfatasa 2A
PS1:	Presenilina 1
PUFAs:	Ácidos grasos poliinsaturados
RE:	Retículo endoplasmático
SNC:	Sistema nervioso central
SOD:	Superóxido dismutasa
TBARS:	Sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico
Tg:	Transgénico
TgAPP:	Ratón transgénico Tg2576 que sobreexpresa la mutación APP ^{swe}
TGN:	Red del trans Golgi
TNF- α :	Factor de necrosis tumoral α
UPS:	Sistema proteasoma-ubiquitina
WT:	<i>Wild type</i>



SUMMARY

Search for antiamyloidogenic compounds with therapeutic potential for Alzheimer's disease

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is considered a multifactorial disease as a result of the existing relations between environmental and genetic factors. One of the key events of this disease is the altered processing of the β -amyloid precursor protein (APP), raising the hypothesis of "the amyloid cascade" which states that the oligomerization and/or aggregation of β -amyloid (β A) peptide is the triggering event of different pathways of neurodegeneration such as oxidative stress, neuroinflammation and apoptosis, that ultimately leads to neuronal death. Therefore, treatment with multitarget drugs might be an interesting strategy to be considered in the research and development of new therapeutic agents to cope with the AD more effectively.

Based on those distinct pathways of neurodegeneration triggered by β A, different studies have determined that phenolic compounds could act as multiple ligands on different pharmacological targets. In this regard, it would be interesting to search for flavonoid compounds with potential neuroprotective capability, particularly possessing antiamyloidogenic activity, in order to bring new multitarget compounds potentially active and effective in preventing this devastating disease.

Objectives

Six compounds from different groups of flavonoids, flavonols (quercetin, rutin and troxerutin), flavones (diosmin and hidrosmin) and flavanones (naringin) will be evaluated at three levels for searching antiamyloidogenic properties with therapeutic potential for AD: in *in vitro* assays, in a APPswe neuroblastoma cell line and in the Tg2576 transgenic mouse overexpressing the human APPswe.

Experimental models

Six compounds from different groups of flavonoids, based on chemical structure, were tested: flavonols (quercetin, rutin and troxerutin), flavones (diosmin and hidrosmin) and flavanones (naringin).

In a first step, several *in vitro* tests for the study of different pharmacological targets based on "the amyloid cascade" were used in order to eventually select the most active compounds, rutin and quercetin.

Second, a cellular model, the human neuroblastoma line transfected with the human APPswe gene was used. The effect of quercetin and rutin on markers of oxidative stress, APP processing and apoptosis of APPswe cells was evaluated at 25-100 nM for 24 hours.

In a third step, an *in vivo* model of experimental Alzheimer, the Tg2576 transgenic mouse overexpressing the human APPswe, was used. Mice were treated with quercetin and rutin, respectively, which were incorporated to a regular diet at the concentration of 200 ppm (equivalent to 28-30 mg of flavonoid per kg of body weight per day). Animals were fed the diet containing flavonoid for 4 weeks and the study ended when animals were 45 weeks-old. Cerebral metabolic, antiamyloidogenic, antioxidant, anti-inflammatory and antiapoptotic activities were evaluated both in wild-type and untreated and flavonoid-treated transgenic mice.

Results and discussion

Among the flavonoid compounds assayed, the most interesting ones were the flavonols, being rutin and quercetin the most active as they positively modified most of the studied targets, highlighting their antiamyloidogenic and antioxidant properties.

Both compounds displayed a significant inhibitory ability of the β A₂₅₋₃₅ aggregation; a significant disaggregating effect of β A₂₅₋₃₅ pre-formed fibrils. The determination of the half-life of the fluorophore β A-ThioT in the presence of either flavonoid allowed to verify both the inhibitory and disaggregating effect of

both rutin and quercetin. In addition, both flavonoids (0.01 & 0.1 μ M) were able to completely inhibit the intracellular generation of free radicals induced by H_2O_2 . Moreover, rutin inhibited the enzymatic activity of BACE in a concentration-dependent manner, thus it could prevent the formation of β A and, in turn, favour the non-amyloidogenic pathway.

In the cell line overexpressing human APPswe, some oxidative stress markers were evaluated, reduced glutathione (GSH) levels as the main intracellular non-enzymatic antioxidant and malondialdehyde (MDA) levels as a marker of lipid peroxidation. It was observed that both quercetin and rutin were able to increase GSH levels and then cellular reducing power, highlighting the effect exerted by rutin. Besides, both flavonoids were able to significantly decrease MDA levels at a concentration-dependent manner, demonstrating a good antioxidant profile.

In order to further study their antioxidant mechanisms, the effect of flavonoid treatments on the main antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase (GR) and glutathione peroxidase (GPx) was evaluated. On the whole, both compounds favored enzymatic activity, protein levels and gene expression of the main antioxidant enzymes, especially quercetin on SOD and rutin on CAT and GR. This could explain why rutin significantly increased GSH levels, since it caused a positive effect on GR enzymatic activity, the main GSH regenerating enzyme; moreover, an increase of the antioxidant defenses would prevent lipid peroxidation.

The proteasomal system is responsible for the quality control of oxidized, denatured and/or aggregate proteins. This system is inhibited by the oxidative stress and therefore compounds which are able to activate it would be very useful in the treatment of AD. Both quercetin and rutin were able to cause a significant increase in the activity of the 20S and 26S proteasome in the APPswe cell line. This activity might promote cellular resistance to oxidative stress by increasing cell survival. Furthermore, both flavonoids increased PARP expression, protein responsible not only for DNA repair at the cell nucleus but for activation of proteasomal system favoring the selective degradation of oxidized proteins such as the oxidized β -amyloid aggregates, facilitating cell adaptation to oxidative stress.

As for the APP processing, it was observed that both flavonoids caused a decrease in APP protein levels and gene expression, being rutin the most active compound. Rutin was able to increase both protein levels and gene expression of ADAM-10, enzyme that hydrolyzes β A between the 16/17 positions, decreasing the likelihood of generating a full-sequence β A and favoring the non-amyloidogenic APP processing pathway.

Various studies have reported a correlation between caspase activation and AD. In the APPswe cell line, rutin was able to inhibit the enzymatic activity and gene expression of caspase 3 and caspase 6. Therefore, compounds inhibiting the activity and/or decreasing expression of these proteases could be of potential interest for AD therapy.

The mouse model Tg2576 overexpressing human APPswe provides a useful tool to examine different intervention ways for the treatment of AD. No significant metabolic changes in the brain, using neuroimaging techniques or autoradiography, were found. Quantification of the expression of ionotropic glutamate receptors by autoradiography revealed no remarkable changes. However, overexpression of APPswe in 45 weeks-old mice triggered a significant oxidative stress, an increase in APP processing through the amyloidogenic pathway, an increase in inflammatory markers and activation of caspase 3 at the hippocampal level, one of the brain areas most affected in AD. Therefore, this 45 week-old animal model constitutes an ideal model for studying potentially active compounds in the prevention and/or slowing down the symptoms of the AD.

The antioxidant effect of quercetin and rutin, showed in the *in vitro* tests and the transgenic cell line APPswe, was also confirmed and substantiated in the transgenic mouse model. Both flavonoids, mainly rutin, reversed oxidative stress as they possess an intrinsic antioxidant activity facing free radicals. They

might be able to induce the expression of neuroprotective genes, such as the transcription factor Nrf2, as they increased the cellular reducing power and reduced lipid peroxidation.

Due to overexpression of APPswe, a general decrease in the antioxidant enzyme activities in the animal model was also observed, although the decrease was not significant in all cases, except for CAT. Animals treated with rutin experienced an increase in CAT and GR activities in both sexes and in both brain areas, which would promote the protection of neurons against oxidative stress and favor the regeneration of GSH.

Regarding APP processing, it was observed that the Swedish mutation favored amyloidogenic pathway of the protein as an increase of BACE activity and APPswe expression and a slight decrease in ADAM10 expression were shown in transgenic mice in comparison with the wild-type mice. Treatments with flavonoids, mainly rutin, were able to inhibit BACE activity and decrease APPswe expression, and tended to increase ADAM10 expression in both brain areas and in both sexes, which would favor the anti-amyloidogenic APP processing.

Several studies have shown that APP hydrolysis by caspase 3 alters the APP proteolytic processing, favoring the amyloidogenic pathway by releasing the C-31 fragment (a potent inducer of apoptosis). Therefore, compounds capable of inhibiting caspase 3 activation would be interesting in the treatment of AD. Quercetin and rutin were able to decrease the activity of hippocampal caspase 3 in male and female mice.

It has been described that inflammation favors APP processing by the amyloidogenic pathway. In the animal model, a significant increase of gene expression of proinflammatory cytokines, especially IL-1 β , in both brain areas and in both sexes, was found. Quercetin and rutin showed remarkable anti-inflammatory properties as they normalize mRNA levels of IL-1 β in both sexes and cerebral cortex and hippocampus.

In order to corroborate the anti-amyloidogenic effect on the animal model study, an additional 4-weeks treatment was carried out ended at 16 months of age. Rutin was able to decrease the number of amyloid aggregates significantly, thus confirming its anti-amyloidogenic effect which was also observed *in vitro* and in APPswe cell line.

Conclusions

From the *in vitro* tests for the assay of the anti-amyloidogenic activity, we may conclude that:

1. Rutin was able to inhibit β -secretase activity in a concentration-dependent manner, which would imply an inhibition in the formation of β -amyloid peptide. The catechol group in the ring B could promote the binding of the compound to the active site of the enzyme and, rutinose in position 3, stabilize such binding.
2. Quercetin showed a slight inhibitory capacity of γ -secretase pentameric complex. The hydroxyl group in position 3 probably contributes to the inhibitory effect of the enzymatic complex since glycosylation in this position completely abolished the effect.
3. Both quercetin and rutin showed a significant inhibitory capacity of the *in vitro* aggregation of the amyloidogenesis and an important effect of disaggregating preformed fibrils. The catechol group in the ring B of both flavonols could disrupt the formation of hydrogen bonds that form the stable structure of the folded sheets of aggregated β .
4. Quercetin and rutin are good candidates for a deeper study in cellular and animal models since they have shown inhibition of BACE and γ -secretase activities and a significant inhibitory capacity of *in vitro* aggregation and disaggregating effect of preformed fibrils.

In the cell line transfected with the human neuroblastoma APPswe gene, used as an experimental model of Alzheimer, it was observed that:

5. Both quercetin and rutin were capable of increasing the levels of the reduced glutathione and therefore the cellular reducing power, as well as lowering levels of lipid peroxidation.

6. The treatment of cells with both flavonoids favored, in general, the enzymatic activity, the protein synthesis and the gene expression of the major antioxidant enzymes: superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase. Rutin especially caused an increase in catalase and glutathione reductase, which could explain the significant increase in the levels of reduced glutathione.

7. Both rutin and quercetin caused a significant increase in the activity of the 20S and 26S proteasome in the APPswe cell line, event which could promote cellular resistance to oxidative stress by increasing cell survival. Furthermore, both flavonoids increased PARP levels and gene expression, protein responsible for DNA repair and activation of the proteasomal system.

8. Rutin and quercetin caused a decrease in the levels and expression of APP, being rutin the most active flavonoid. Furthermore, treatment of APPswe cells with rutin induced an increase in expression and levels of ADAM-10, which could favor the non-amyloidogenic APP processing pathway.

9. Rutin was able to inhibit the enzymatic activity and expression of caspase 3 and caspase 6. Pharmacological inhibition of these proteases can be of great interest since APP can be a caspase substrate whose enzymatic hydrolysis can release neurotoxic fragments that promote neurodegeneration.

10. Therefore, the assays on APPswe cells corroborated a good antioxidant profile of quercetin and rutin, and the *in vitro* assays substantiated an antiamyloidogenic activity for both flavonoids.

Ultimately, the transgenic mice (Tg2576) overexpressing human APPswe was used as an experimental model of Alzheimer for studying the *in vivo* potential neuroprotective effect of rutin and quercetin.

11. Regarding the animal model, at 45 weeks of age, no significant changes were found in brain metabolism between mice wild-type and transgenic mice, or alterations in the expression of glutamate receptors (NMDA, AMPA and kainate). Neither signs of neurodegeneration nor alterations in the nuclear morphology of hippocampal neurons were detected.

12. Overexpression of APPswe at 45 weeks of age triggered the following in both brain areas: a) a marked oxidative stress caused by a general decrease in antioxidant enzyme activity, a decreased cellular reducing power and an increase of lipid peroxidation; b) the favouring of the amyloidogenic pathway since the enzymatic activity of β -secretase and expression of APPswe were elevated, ADAM10 expression was slightly diminished and caspase 3 activity was increased; c) an increase in inflammatory markers, particularly IL-1 β , according to the observation broadly reported that inflammation promotes the processing of APP by the amyloidogenic pathway, thus promoting the aggregation of β -amyloid peptide.

13. The changes described above in the animal model were found in both male and female mice.

14. Both male and female animals treated with rutin experienced an increase in the activity of catalase and glutathione reductase in cortex and hippocampus, a fact that would promote neuronal protection against oxidative stress and a marked decreased number and size of β -amyloid aggregates, thus corroborating the antiamyloidogenic effect observed *in vitro* and in the cell model.

15. Animal treatment with both flavonoids, especially rutin, were able in both male and female mice of: a) inhibiting enzyme activity of β -secretase, decreasing APPswe and increasing ADAM10 expression in cortex and hippocampus; b) normalizing the expression of IL-1 β in both brain areas; c) decreasing the activity of caspase 3 at the hippocampal level.

Final conclusion: both rutin and quercetin, by their antioxidant, antiamyloidogenic, antiapoptotic and anti-inflammatory activities, could prevent and/or slow several manifestations observed in Alzheimer's disease because they have shown beneficial properties on multiple drug targets evaluated in different models for the study of this disease.



INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: MARCO HISTÓRICO, SINTOMATOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA

La enfermedad de Alzheimer (EA) se conoce desde hace más de un siglo, cuando en el año 1907 Alois Alzheimer, psiquiatra y anatomopatólogo alemán, publicó el estudio clínico y anatómico de una paciente de 51 años de edad (Augusta D.) que falleció tras 4 años y 6 meses de sufrir un cuadro grave de demencia progresiva. El 4 de noviembre de 1906 Alois Alzheimer presentó su observación anatomoclínica con la descripción de los cambios cognitivos e histopatológicos de placas seniles, ovillos neurofibrilares (ONF) y cambios arterioescleróticos cerebrales. El trabajo se publicó al año siguiente con el título "Una enfermedad grave característica de la corteza cerebral" (Stelzmann et al., 1995). La denominación del cuadro clínico como enfermedad de Alzheimer fue introducida en 1910 por Emil Kraepelin, alumno de Alzheimer, en la octava edición de su "Manual de psiquiatría". Con posterioridad, en 1911, Alzheimer describió con detalle un nuevo caso, la historia clínica de Johann F., que acompañó con imágenes histopatológicas muy ilustrativas.

Desde que Alois Alzheimer describiera las características de la enfermedad hasta la actualidad, muchos han sido los hallazgos científicos para la comprensión de esta enfermedad. Sin embargo, aunque cada día se sabe más sobre la enfermedad, aún se desconocen las causas y no se dispone de un tratamiento eficaz.

La EA es una enfermedad neurodegenerativa progresiva e irreversible del sistema nervioso central (SNC), de etiología desconocida, y asociada a una pérdida progresiva de las funciones cognitivas (memoria y capacidades intelectivas en general), alteraciones psicológicas y del comportamiento, resultando finalmente en demencia. Presenta características clínicas y anatomopatológicas propias, ligada íntimamente con la edad. Por su gran heterogeneidad anatomoclínica y gran variabilidad tanto evolutiva como en su expresión clínico-patológica se puede considerar un síndrome.

Morfopatológicamente, la EA se define por la aparición de placas seniles y ONF, los cuales se sitúan fundamentalmente en la corteza cerebral, sobre todo, en áreas temporoparietales (Price and Morris, 1999). Además, se puede observar atrofia cortical, predominantemente en el lóbulo temporal, con extensa pérdida neuronal. Estos rasgos neuropatológicos, son claves para el diagnóstico *post-mortem* de la enfermedad.

Clínicamente, la EA se caracteriza como una demencia de inicio insidioso con deterioro cognitivo y funcional progresivo, con la aparición gradual de alteraciones psicológicas y conductuales. La pérdida de memoria es uno de sus primeros síntomas y, a lo largo de su evolución se van añadiendo otros déficits cognitivos: apraxia (alteración de los gestos, ya que aunque la función motora no se ve afectada, los pacientes son incapaces de realizar tareas rutinarias), afasia (alteración del lenguaje), agnosia (incapacidad de reconocimiento de personas u objetos), desorientación, disfunciones sensoriales, e incapacidad para el razonamiento. Todo ello produce un deterioro progresivo en la capacidad funcional del individuo, así como cambios en la personalidad, paranoia, alucinaciones, apatía, perturbación del sueño y depresión (Reiman and Caselli, 1999). En sus etapas avanzadas, la enfermedad conduce a la demencia y finalmente a la muerte.

Desde el comienzo de los primeros síntomas, la enfermedad dura una media de 7 a 10 años, durante los cuales va aumentando la dependencia de los enfermos (Law et al., 2001), lo que conlleva a un elevado gasto económico tanto para el sistema de salud, como para la familia. Por ello el desarrollo de nuevas terapias que permitan retardar su establecimiento o alargar la vida, sería fundamental en una sociedad cada vez más envejecida.

Hoy en día, la aparición de la EA es diez veces superior a la detectada a comienzos del siglo XX, debido a la mejora en el diagnóstico y a la mayor supervivencia de los enfermos, pero sobre todo por el progresivo envejecimiento de la población. Por tanto, la EA constituye la causa más común de demencia entre personas de edad avanzada (Morishima-Kawashima and Ihara, 2002). El número de pacientes actualmente supera los 35,6 millones a nivel mundial y se calcula que el año 2050 esta cifra podría llegar

a los 115 millones de afectados (Morley et al., 2012), representando el tercer problema más grave de salud en países desarrollados, después de los accidentes cardiovasculares y el cáncer.

2. FACTORES DE RIESGO

2.1. FACTORES GENÉTICOS

La genética de la EA es compleja y heterogénea. La mayoría de los casos son “esporádicos”, de inicio tardío, sin aparente recurrencia familiar de la enfermedad. Sin embargo, la EA familiar que, por lo general, se transmite de forma autosómica dominante, representa un pequeño porcentaje de los casos de EA (1-2%); se manifiesta de forma precoz sobre los 65 años de edad, incluso hay pacientes que desarrollan los primeros síntomas a los 40 años (Guerreiro et al., 2012).

Aunque la EA familiar es mucho menos frecuente que la forma esporádica, ambas presentan los mismos caracteres histopatológicos (placas seniles y ONF), sugiriendo una patogénesis común (Van Gassen and Annaert, 2003). Hasta la fecha, se han identificado tres genes cuyas mutaciones causan EA familiar: el gen de la proteína precursora de β -amiloide (*APP*) localizado en el cromosoma 21, el gen de la presenilina 1 (*PS1*) en el cromosoma 14 y el gen de la presenilina 2 (*PS2*) situado en el cromosoma 1 (Tabla 1).

El componente genético de la EA esporádica ha sido el objetivo de un gran número de estudios, ya que sólo un factor de riesgo genético, el alelo 4 de la apolipoproteína E (ApoE4), se ha asociado de manera consistente con la enfermedad (Guerreiro et al., 2012). En los últimos años, los avances tecnológicos han permitido realizar estudios con nuevos enfoques. Uno de estos estudios es el de asociación del genoma completo (GWAS: Genome-wide association study) o WGAS (Whole genome association study) que estudia la asociación de genes a caracteres de la enfermedad. En la EA se han realizado varios GWAS y hasta el momento se han propuesto nueve genes que podrían estar implicados en la EA “esporádica” tales como: *CLU*, *PICALM*, *CR*, *BIN1*, *ABCA7*, *MS4A*, *CD2AP*, *CD33* y *EPHA1* (Harold et al., 2009; Lambert et al., 2009; Seshadri et al., 2010; Hollingworth et al., 2011; Naj et al., 2011). Sin embargo, ninguno de estos genes se ha asociado de manera consistente con la enfermedad (Guerreiro et al., 2012).

Tabla 1. Genes asociados a la EA (Guerreiro et al., 2012).

GENES	LOCALIZACIÓN	COMIENZO	TIPO
<i>APP</i>	21 q21.3-q22.05	Temprano	Familiar
<i>PS1</i>	14q24.3	Temprano	Familiar
<i>PS2</i>	1q31-q42	Temprano	Familiar
<i>ApoE</i>	19q32.2	Tardío	Esporádico y Familiar

Entre los distintos factores genéticos que se han descrito, se piensa que solo unos pocos inducen la enfermedad, mientras que la mayoría de ellos se encuentran asociados a la EA esporádica. Se piensa que actúan como agentes que predisponen, es decir, que no inducen la enfermedad, aunque incrementan la probabilidad de esta dolencia en la población. De hecho, se cree que estos factores genéticos interactúan con factores ambientales, con otras patologías o con distintas condiciones fisiológicas para poder ejercer su efecto patológico. Además, son capaces de tener un efecto sinérgico, de manera que se potencie su patogenicidad y por tanto la probabilidad de desencadenar la enfermedad (Rocchi et al., 2003; Hoenicka, 2006).

2.2. FACTORES NO GENÉTICOS

El principal factor de riesgo para la EA es la edad avanzada (Katz et al., 2012). Junto a ésta, los traumatismos craneales, incrementan el riesgo de EA, probablemente por inducir lesiones cerebrales aunque sean subclínicas, si bien, también podría ser que se acelerara el depósito del péptido beta

amiloide (β A) (Johnson et al., 2010). Como ejemplo, la demencia pugilística, asociada con traumatismos craneales crónicos, se desarrolla con una neuropatología similar a la EA: placas de β A, ONF, activación de la glía y neuroinflamación (Saing et al., 2012).

También, se ha descrito que una mayor reserva cognitiva (un concepto que combina niveles de educación, tipo de ocupación y realización de actividades mentales complejas) se asocia con menor incidencia de EA, especialmente en edades más avanzadas (Roe et al., 2008).

Con respecto a otros factores de riesgo modificables, se encuentran los relacionados con el estilo de vida, la obesidad a mediana edad (Luchsinger et al., 2011), la falta de actividad física (Scarmeas et al., 2010), el consumo de tabaco (Rusanen et al., 2010) y alcohol (Anstey et al., 2009). Los factores de riesgo vascular (hipertensión arterial y colesterol) también son importantes por implicar lesiones cerebrales vasculares (Goldstein et al., 2008; Elias and Davey, 2012); el colesterol elevado también puede actuar de forma directa sobre el metabolismo del β A facilitando su formación y depósito (Reiss and Voloshyna, 2012). En concordancia con los datos anteriores, se ha comprobado que el tratamiento con antihipertensivos (Haase et al., 2013) y estatinas (Butterfield et al., 2011; Sparks, 2011) disminuye el riesgo de padecer la EA.

Las relaciones entre depresión y EA o demencia son complejas. Por un lado, la depresión se puede manifestar como un deterioro cognitivo e incluso una demencia, por otro lado, la depresión puede ser el primer síntoma de una EA (Vilalta-Franch et al., 2012). Las evidencias disponibles apuntan a que la depresión aún cuando se padezca muchos años antes, supone un factor de riesgo para la EA (Gracia-García et al., 2013).

Una revisión reciente estima que la intervención en algunos de estos factores de riesgo podría prevenir alrededor de un millón de casos de EA en todo el mundo (Barnes y Yaffe, 2011).

3. PROTEÍNA PRECURSORA DE β -AMILOIDE (APP)

Las placas seniles y los ONF, son los rasgos histopatológicos característicos que permiten hacer el diagnóstico definitivo de la EA (Zhang et al., 2012). Glenner y colaboradores estudiaron la composición química de las placas seniles y hallaron que su componente mayoritario era un pequeño péptido que se denominó β A (Glenner et al., 1984). La secuenciación del péptido permitió aislar el gen que codificaba una proteína de mayor tamaño que contenía en su secuencia este péptido. La proteína se denominó “proteína precursora del amiloide” o APP (código 104760 de la base de datos de genes humanos OMIM, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>).

APP es una proteína transmembrana tipo I que se localiza en todos los tipos celulares y su ARNm representa el 0,2% del total en neuronas. Es una proteína muy conservada evolutivamente ya que se puede encontrar en todos los mamíferos vertebrados e incluso se conoce una proteína APP-*like* en *Drosophila*, por lo que podría ser un gen “housekeeping”, regulador.

APP contiene una señal terminal peptídica, un gran ectodominio para N-glucosilaciones, una región transmembrana en forma de hélice y un pequeño dominio citoplasmático (Figura 1). La secuencia amino terminal de APP (N-APP) revela que APP podría pertenecer a la superfamilia de factores de crecimiento ricos en cisteína con un sitio de unión a heparina (Rossjohn et al., 1999). El dominio de unión a cobre (CuBD) presenta una estructura similar a las chaperonas de cobre. En base a la estructura terciaria de CuBD, se sabe que el cobre se une a los residuos aminoacídicos His147, His149, y His151. Spoerri y col (2012) reportaron que las histidinas 149 y 151 son cruciales para la estabilidad de CuBD y para el metabolismo de APP. Las mutaciones de His149 y His151 por asparagina en este dominio provocan una disminución del procesamiento proteolítico de APP, alterando su tráfico del retículo endoplasmático al aparato de Golgi y promoviendo la oligomerización defectuosa de APP en células HEK293 (Spoerri et al., 2012).

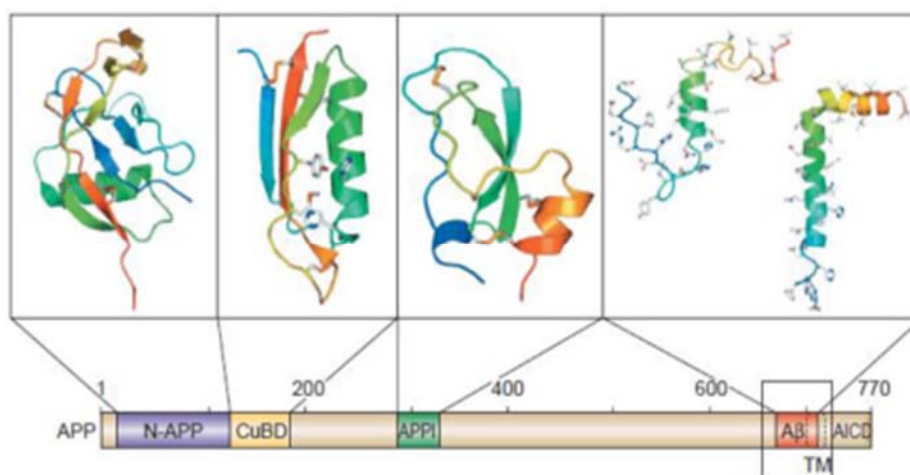


Figura 1. Representación esquemática de la proteína APP 770. Se muestra el dominio βA y varios dominios funcionales. N-APP, secuencia amino terminal de APP que contiene un dominio de unión a heparina; CuBD, dominio de unión a cobre; APPI, dominio inhibidor de serina proteasa tipo Kunitz; TM, dominio transmembrana; AICD, dominio intracelular de APP (Bossy-Wetzel et al., 2004).

Existen, al menos, 3 isoformas de la proteína APP en humanos, obtenidas por “empalme” alternativo de los exones 7 y 8: 695 (695APP), 751 (751APP) y 770 (770APP) aminoácidos respectivamente, (Hung and Selkoe, 1994; Walter et al., 1997). APP751 y APP770 se expresan en muchos tejidos y se caracterizan por la presencia de un exón que codifica una secuencia de 56 aminoácidos homóloga a una proteasa inhibidora de serina de tipo Kunitz (KPI) que se ubica en la región extracelular de la proteína.

APP695 se expresa predominantemente en neuronas y no contiene el dominio KPI (Rohan de Silva et al., 1997). En los pacientes con EA, se ha observado a nivel cerebral una elevación marcada de los niveles de ARNm de isoformas de APP que contienen el dominio KPI. El incremento de la deposición del péptido βA (Menendez-Gonzalez et al., 2005) y una prolongada activación extrasináptica del receptor NMDA (N-Metil D-Aspartato) podrían cambiar la expresión de APP695 a isoformas que contienen el dominio KPI y generar un aumento de la producción de βA (Bordji et al., 2010). Estos hallazgos sugieren que la alteración en el “splicing” alternativo del ARNm de APP podría contribuir a la patogénesis de la EA (Zhang et al., 2011).

3.1. FUNCIONES

Un gran número de funciones se han atribuido a la holoproteína APP (Bossy-Wetzel et al., 2004; Reinhard et al., 2005). Al parecer, el ectodominio amino-terminal soluble del APP liberado por α -secretasa (α -APPs), actuaría como un factor autocrino, además de poseer propiedades neurotróficas y neuroprotectoras (Jiang et al., 2013).

En estudios *in vitro* se ha observado que aquellas holoproteínas que contienen el dominio KPI son capaces de inhibir a las proteasas de tipo serina así como tripsina y quimiotripsina, incluso pueden inhibir al factor XIa (serina proteasa) que participa en la coagulación. Además, se ha descrito la participación de APP en la interacción célula-célula, por lo que interviene en mecanismos de adhesión celular, cuando se inserta en la membrana plasmática, incluso se le ha atribuido un papel trófico y propiedades neuroprotectoras, en concreto esta función fisiológica es atribuida a α -APPs, el cual es liberado desde los terminales presinápticos en respuesta a actividades eléctricas, regulando la excitabilidad neuronal, potencia la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria, posiblemente por activación de receptores de superficie que modulan canales de potasio e incluso activando el factor nuclear de transcripción kappa B (NF- κ B) (Jiang et al., 2013).

APP también se ha relacionado con el transporte axonal de vesículas (Kamal et al., 2001). La molécula de APP participa en el transporte axonal anterógrado a través de la unión directa con la subunidad pequeña de la Kinesina-I (proteína motora de los microtúbulos). Varios estudios sugieren que una alteración en el transporte de APP podría ser uno de los factores que podrían desencadenar el comienzo de la EA.

APP pertenece a una familia de proteínas que incluyen otras 2 proteínas similares a APP (APP-like), una proteína 1 (APLP1) y 2 (APLP2) en mamíferos (Coulson et al., 2000). Todas son proteínas de membrana de tipo I y se procesan de forma similar. Comparten diversos dominios como E1 y E2 a nivel de la secuencia extracelular. Se ha reportado que estos ratones transgénicos son viables, fértiles y poseen un fenotipo anormal leve (Dawson et al., 1999). Los ratones nulos para APLP1 y APLP2 también son viables y fértiles.

Sin embargo, el grupo de Herms (2004) ha desarrollado un modelo de ratones triple transgénico “knockout” APP/APLP1/APLP2. Estos animales mueren prematuramente, mostrando síntomas de un extraño desorden neurológico. En humanos este fenómeno es conocido con el nombre de Lisencefalia “en empedrado” (Cobblestone Lissencephaly), en el cual el cerebro no presenta circunvoluciones. A nivel morfológico, estos ratones muestran una gran displasia (caracterizada por una fragmentación de la lámina basal). Los mecanismos moleculares implicados en estos procesos se desconocen actualmente, pero estas observaciones ponen de manifiesto el importante papel del APP en procesos de adhesión y migración celular. (Herms et al., 2004).

3.2. PROCESAMIENTO DE APP

La proteína es sintetizada en el retículo endoplasmático (RE) y es transportada a través de aparato de Golgi hasta la red del trans Golgi (TGN, trans-Golgi-network), encontrándose en concentraciones elevadas en neuronas en estado estacionario (Greenfield et al., 1999). APP se transporta en vesículas secretoras desde la TGN hacia la superficie celular. APP es extensamente modificado postraduccionalmente mediante glucosilaciones (N- u O- glucosilaciones) complejas que tienen lugar rápidamente justo después de sintetizarse en el RE. Además, se producen fosforilaciones y sulfataciones durante el tránsito hacia la membrana plasmática en la vía secretora. La APP durante la secreción e internalización a través de la vía secretora, puede sufrir una variedad de escisiones proteolíticas por tres proteasas llamadas α -, β -, γ -secretasas. Dichas escisiones se agrupan en dos vías: la vía amiloidogénica y la vía no amiloidogénica.

Vía no amiloidogénica

La primera actividad proteolítica descrita en la Figura 2, fue la denominada α -secretasa, la cual realiza una escisión en el APP695 dentro del dominio β A, entre los residuos Lys687 y Leu688 (residuos aminoacídicos 16 y 17 del β A). Como consecuencia de este procesamiento proteolítico se libera el α -APPs al lumen extracelular o al lumen vesicular, incluyendo los residuos aminoacídicos del 1 al 16 del β A, mientras que anclada a la membrana queda una secuencia de 83 residuos aminoacídicos junto con el extremo carboxi-terminal (APP-C83). La producción de α -APPs se incrementa como respuesta a la actividad eléctrica y a la activación de los receptores muscarínicos, lo que sugiere que la actividad neuronal incrementa el procesamiento proteolítico de APP por la α -secretasa.

Posteriormente, el fragmento carboxi-terminal anclado a la membrana puede sufrir una escisión por la γ -secretasa entre los residuos aminoacídicos 711 y 713, liberando por una parte un péptido llamado p3 al lumen extracelular o vesicular y por otra el dominio intracelular del APP (AICD) al citosol celular. AICD forma parte de un complejo de transcripción junto con FE65 y TIP60. Este complejo es translocado al núcleo participando en la regulación de varios genes.

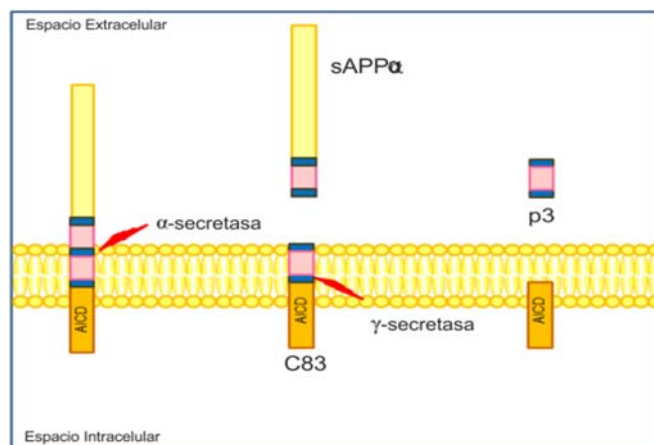


Figura 2. Procesamiento de APP: Vía no amiloidogénica, escisión llevada a cabo por α y γ secretasa respectivamente.

Las enzimas que llevan a cabo la actividad α -secretasa corresponden a los miembros de la familia de las desintegrinas y metaloproteasas (ADAM). Otros candidatos son TACE, proteasa que corta el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), así como MDC9 (Selkoe, 2001b; Blennow et al., 2006), siendo los más representativos ADAM 9, 10, 17 y 19 (Asai et al., 2003; Tanabe et al., 2007). Hasta el momento no está claro cuál es la relevancia de estas proteasas en los pacientes con EA. Sin embargo, en modelos experimentales de ratones con la EA, se ha observado que la sobreexpresión de ADAM10 reduce la síntesis y la deposición del péptido β A, junto con una reducción del déficit cognitivo (Postina et al., 2004). Por tanto, ADAM10, es hasta el momento, un buen candidato con actividad α -secretasa con potencial actividad antiamiloidogénica de gran interés para el tratamiento de la EA. No obstante, no se puede descartar que otros miembros de la familia ADAM, también sean relevantes en la producción del sAPP α .

ADAM es considerada constitutivamente activa en la superficie de la membrana plasmática y se cree que APP se procesa principalmente por esta vía proteolítica (De Strooper and Annaert, 2000). Por el contrario, la enzima α -secretasa a nivel de la TGN, es regulada por la proteína quinasa C (PKC) y compite con la enzima β -secretasa (BACE) (Skovronsky et al., 2000). No está claro qué proteína ADAM específica está asociada con una actividad α -secretasa constitutiva o inducible, pero si se sabe que ADAM10 puede ser activada por calcio (Le Gall et al., 2009).

Vía amiloidogénica

Alternativamente al procesamiento proteolítico descrito anteriormente, la molécula de APP puede sufrir una escisión diferente mediante la enzima BACE (Figura 3). Entre 1999-2000, varios grupos de investigación identificaron simultáneamente esta enzima (también llamada Asp2 o memapsin 2) como la principal BACE cerebral, ésta es una aspartil proteasa transmembrana de tipo I con un dominio amino terminal dirigido hacia el lumen de la célula, en el que se localizan dos dominios que conforman el sitio activo característico de las aspartilproteasas, teniendo así la orientación topológica necesaria para poder degradar la APP en la posición β . Se localiza intracelularmente en el RE, en la cara Trans del aparato de Golgi y en compartimentos endosomales, lugares donde tiene lugar el procesamiento de APP y la hidrólisis se realiza a pH ácido.

BACE digiere APP entre los residuos aminoácidos Met671 y Asp672, originándose un ectodominio amino-terminal soluble ligeramente más pequeño (β -APPs), mientras que la secuencia anclada en la membrana es de mayor tamaño, y posee 99 residuos aminoácidos (APP-C99), el cual a su vez puede sufrir un corte proteolítico por caspasas dando lugar al péptido neurotóxico C-31.

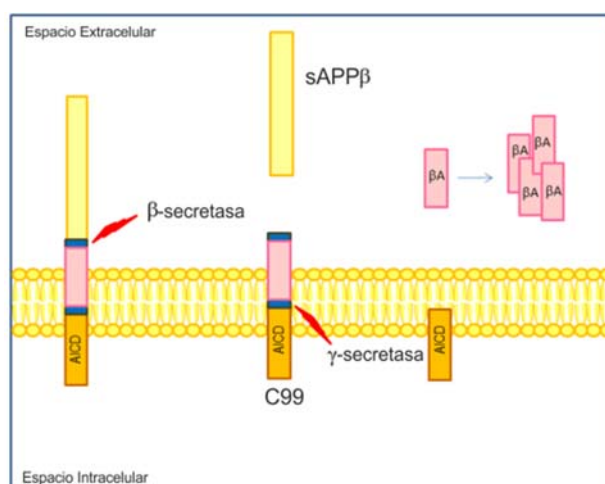


Figura 3. Procesamiento de APP: Vía amiloidogénica, escisión llevada a cabo por β y γ secretasa respectivamente.

Diversos estudios han puesto de manifiesto que BACE es la enzima clave en la producción del péptido βA de 42 residuos, ya que mutaciones en la proteína APP sobre la posición de degradación no afectan la producción del péptido insoluble, mientras que mutaciones en la posición de ruptura de BACE dan lugar a un incremento de esta producción. Por ejemplo, la enzima muestra preferencia proteolítica en la posición de lisis, por la variante sueca de la APP frente a la forma común, incrementando entre cinco y seis veces la producción del βA_{1-42} (Citron et al., 1992; Cai et al., 1993).

Posteriormente a la actividad BACE, la secuencia anclada a la membrana es sustrato para la γ -secretasa, que lleva a cabo una escisión proteolítica dentro del dominio transmembrana a nivel de los residuos aminoacídicos 711-713, liberando el péptido βA_{1-40} y βA_{1-42} al lumen extracelular o vesicular y AICD al citosol.

La γ -secretasa o secretasoma consiste en un complejo proteico de alto peso molecular que contiene cinco proteínas: PS1, PS2, nicastrina (Nct), APH-1 y PEN2 ("Presenilin enhancer-2"). Aunque no se conoce el papel exacto que cada proteína desempeña en el complejo, evidencias crecientes sugieren que la PS proporciona el centro catalítico del complejo, que la nicastrina y Aph-1 son necesarias para la estabilización de la PS, mientras que PEN2 está implicada en la endoproteólisis de la PS y en la estabilización de los fragmentos resultantes de la misma y CD147 posiblemente funcione como un regulador no esencial del complejo cuya ausencia incrementa la actividad (Kaether et al., 2006; Zhou et al., 2006a).

También se desconoce el papel que cada componente del complejo γ -secretasa juega en la formación del mismo. Se ha propuesto que la PS en forma de holoproteína forma un complejo proteico de bajo peso molecular que es rápidamente degradado. Una fracción de la PS se estabiliza por unión a Aph-1 y a la Nct, aunque el complejo resultante carece de actividad γ -secretasa. El paso final en la maduración del complejo γ -secretasa se produce cuando se incorpora PEN2, que facilita la endoproteólisis de la PS, confiriéndole la actividad γ -secretasa al complejo (Perez-Tur, 2001; Selkoe, 2001a; Vetrivel et al., 2006).

Tanto PS1 como PS2 son proteínas integrales de membrana con un alto grado de homología. Se localizan fundamentalmente en el RE y posiblemente, en vesículas de transporte entre éste y el aparato de Golgi, aunque también se han detectado en la membrana plasmática y en compartimentos endocíticos. Se les ha atribuido varias funciones; Vito y col., (1996) observaron que la parte C-terminal de PS2 podía estar implicada en la regulación de procesos apoptóticos (Vito et al., 1996). Más tarde, Wolozin y col., (1996) observaron que las células transfectadas con PS2 presentaban una mayor susceptibilidad frente a estímulos apoptóticos, y que esta susceptibilidad se veía aumentada cuando la proteína sobreexpresada incluía mutaciones causantes de la EA (Wolozin et al., 1996). Por otra parte,

experimentos que utilizan el sistema de doble híbrido en levaduras han identificado a Bcl-XL como un elemento que interacciona con el dominio C-terminal de las PS. La Bcl-XL es una proteína implicada en la regulación negativa de la apoptosis; aparentemente este efecto implicaría la intervención de intermediarios en el proceso apoptótico (Alberici et al., 1999).

El desarrollo de modelos animales “knockout” en los que se eliminó el gen de la PS1, proporcionó información importante sobre la función de esta proteína, ya que se observó que la delección del gen provocaba letalidad embrionaria de los animales. La muerte era debida a anomalías en el desarrollo del esqueleto y a hemorragias en el SNC de los ratones transgénicos (Shen et al., 1997). A partir de estos hallazgos se demostró que también intervenía en cascadas de señalización de Notch.

Notch constituye una familia de receptores que son críticos para el desarrollo embrionario al dirigir el destino celular a través de la unión de ligandos específicos, de manera que median la comunicación intercelular (Perez-Tur, 2001). Diversos trabajos han demostrado que las PS pueden estar implicadas en el procesamiento de Notch. Se ha descrito que las células de ratón desprovistas de PS1 muestran una marcada disminución de la liberación del dominio intracelular de Notch (NICD) (Song et al., 1999). También se ha reportado que compuestos peptidomiméticos, diseñados para inhibir el procesamiento de APP por γ -secretasa, ejercen un efecto importante en la inhibición del procesamiento intramembranoso de Notch (Wolfe et al., 1999), y que formas mutadas de PS1, con sustituciones Asp-Ala, bloquean el procesamiento γ -secretasa de C83 y C99. También inhiben la liberación de NICD y su paso al núcleo (Berezovska et al., 2000).

Por el contrario, los ratones en los que se elimina el gen de PS2 no sufren un fenotipo tan visible, son animales viables y fértiles, con fibrosis pulmonar leve y con tendencia a padecer hemorragias con la edad. De hecho, la ausencia de PS1 y 2 produce un fenotipo similar al ocasionado por la eliminación de la vía Notch de señalización celular en el desarrollo embrionario. Por lo tanto, el estudio del fenotipo de los ratones “knockout” de PS1, PS2 o ambas, sugiere que las presenilinas pueden desempeñar un papel clave en la señalización mediada por Notch durante el desarrollo (Sisodia and St George-Hyslop, 2002).

4. HIPÓTESIS DE LA CASCADA DE β A

Es un hecho conocido que los pacientes con síndrome de Down acaban desarrollando EA de forma invariable, aunque la relación se desconoce. No fue hasta mediados de los años 70 cuando se descubrió el gen de la proteína APP, localizado en el cromosoma 21, y que un aumento en la dosis génica debida a la trisomía era responsable de la existencia de patología tipo EA en el síndrome de Down. Este hallazgo proporcionó un fuerte respaldo a la hipótesis de que el péptido β A era un elemento fundamental en la etiopatogenia de la EA (Masters et al., 1985; Busciglio et al., 2002).

Posteriormente, en los años 90 se descubrieron las primeras mutaciones en el gen APP relacionadas con la EA familiar. Este fue el preludio de la formulación de una de las teorías que intentaba explicar el origen de la EA, la “hipótesis de la cascada amiloide” (Tiiman et al.; Selkoe, 1991a; Bossy-Wetzel et al., 2004). La agregación de los fragmentos hidrofóbicos β A₁₋₄₀ y β A₁₋₄₂ desencadena la formación de placas extracelulares insolubles conocidas como placas seniles, que según esta hipótesis, son las responsables de la muerte neuronal (Selkoe, 1991b).

Las placas seniles o agregados amiloides, están formadas por depósitos amorfos de péptidos β A cuyo tamaño puede variar de 39 a 43 residuos aminoacídicos, que se encuentran rodeados de axones y dendritas distróficas, así como de astrocitos y microglía activada (Figura 4). Este tipo de lesiones se localizan principalmente en regiones límbicas (hipocampo y amígdala) y también en regiones corticales y subcorticales. Además, el péptido β A se deposita alrededor de los vasos sanguíneos afectando su funcionalidad, lo que se denomina como angiopatía amiloidea.

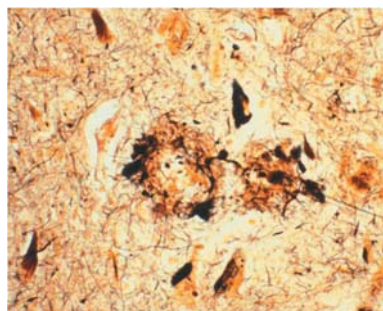


Figura 4. Placas neuríticas en el cerebro de un paciente de EA con tinción de plata (Bossy-Wetzel et al., 2004).

Asimismo, se ha encontrado que el depósito de βA ocurre antes que otros eventos patológicos como la formación de ONF o la muerte neuronal, lo cual apoya la teoría amiloide de la enfermedad (Donev et al., 2009). En la Figura 5, se muestran las diferentes fases de desarrollo de la enfermedad que sustentan la teoría de la cascada amiloide.

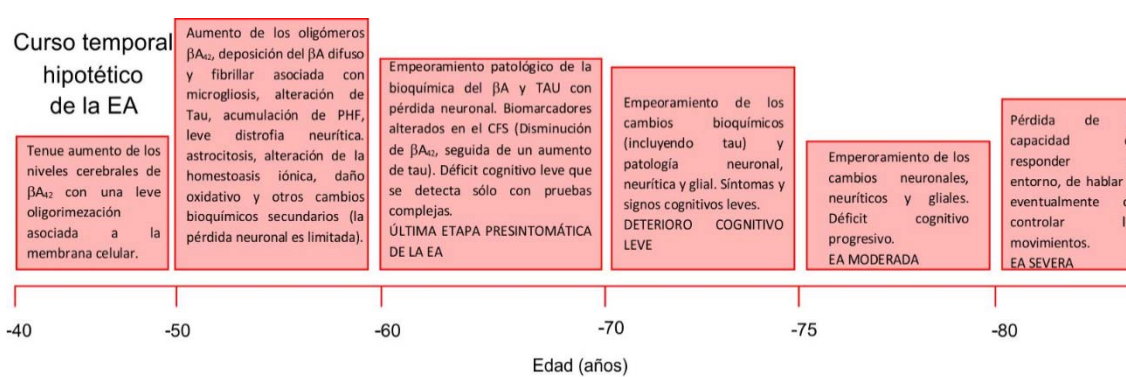


Figura 5. Fases presintomáticas y sintomáticas de la EA en base a la teoría de la cascada amiloide.

La “hipótesis amiloide” (Figura 6) establece que la EA se inicia con la sobreexpresión del péptido βA . La forma oligomérica soluble del péptido provocaría daños a nivel sináptico causando de forma directa déficits de memoria, mientras que los agregados amiloides generarían alteraciones en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE). El atrapamiento del péptido βA en el cerebro desencadena la cascada de neurotoxicidad que provoca la muerte celular por apoptosis, excitotoxicidad, inflamación y estrés oxidativo. Además, se ha descrito que la sobreexpresión del péptido activa la fosforilación de Tau a través de la GSK-3 β , promoviendo la formación de los ONF responsables del proceso neurodegenerativo a nivel intracelular (Morley et al., 2012).

Se han descrito múltiples evidencias que apoyan esta teoría. Uno de los primeros indicios para su formulación fue la observación de que un porcentaje importante de casos de EA familiar de aparición precoz se producían por mutaciones de los genes *APP*, *PS1* y *PS2* (Bekris et al., 2010). Por lo general, estas mutaciones conducen a un aumento en la producción del βA y del cociente $\beta A_{1-42}/\beta A_{1-40}$, aunque es un tema de debate si se produce un aumento tóxico o una pérdida de las funciones fisiológicas de APP y las PS (De Strooper, 2007; Wolfe, 2007). Asimismo, en base a las mutaciones de los genes *APP*, *PS1* y *PS2* asociados al desarrollo de EA familiar, se han generado multitud de modelos animales que desarrollan placas y muestran alteraciones en la memoria (Pimplikar, 2009).

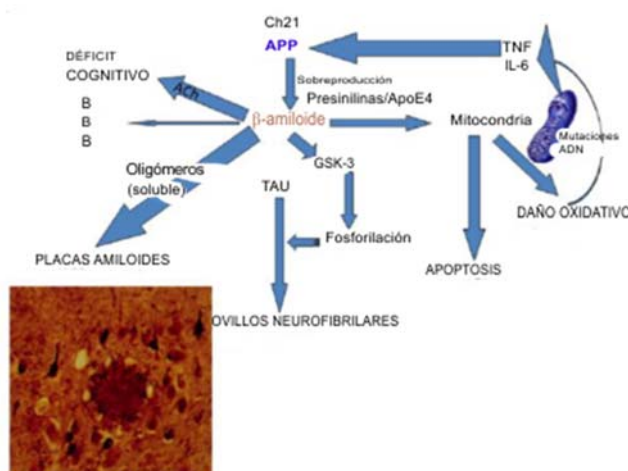


Figura 6. Hipótesis de la cascada amiloide. Secuencia de efectos patogénicos que dan lugar a la EA (Morley et al., 2012)

En cultivos celulares se ha demostrado la neurotoxicidad del péptido β A (Pimplikar, 2009; Kawahara, 2010). Además, se ha observado que induce distintos efectos citotóxicos, como estrés oxidativo o alteraciones en la homeostasis del calcio que, directa o indirectamente, pueden conducir a la muerte neuronal (Evangelisti et al., 2012; Garcia-Escudero et al., 2013; Honarnejad et al., 2013). También es capaz de alterar la actividad de distintas quinasas como GSK-3 β o Cdk5, causando hiperfosforilación de Tau y formación de ONF (Lopes et al., 2010; Cai et al., 2012).

También existen evidencias en contra de la hipótesis amiloide. Por ejemplo, se han encontrado placas de amiloide en autopsias de personas de elevada edad sin signos de demencia (Morishima-Kawashima et al., 2000). Además, los avances en las técnicas de neuroimagen *in vivo* como la retención del compuesto de Pittsburg (^{11}C -PiB), que se emplea para visualizar β A, también han mostrado depósitos en personas con una función cognitiva normal (Nordberg, 2008; Villemagne et al., 2008).

En el caso de los modelos de ratón se ha observado que presentan déficits de memoria mucho antes de que las placas aparezcan en el cerebro (Lesne et al., 2008). También, se ha descrito que las mutaciones en *PS1*, que causan la gran mayoría de los casos de EA familiar, tienen efectos neurotóxicos que son independientes de la función γ -secretasa de la PS en el procesamiento de APP y la producción de β A (Shen and Kelleher, 2007; Kallhoff-Munoz et al., 2008). Estos hallazgos requieren mayor estudio del proceso neurodegenerativo que se desencadena en la EA y de este modo aportar nuevas alternativas en la búsqueda de compuestos para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad.

4.1. TOXICIDAD DEL PÉPTIDO β A

El β A se secreta de manera constitutiva en células normales en cultivo y se detecta como péptido circulante en plasma y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Haass and Selkoe, 2007). El modelo propuesto para la formación de las placas de amiloide establece que, en condiciones fisiológicas, la neurona produce y secreta β A en forma de monómeros y trímeros, que una vez en el fluido intersticial se expanden de forma controlada. Sin embargo, cuando por alguna razón el monómero se despliega, forman dímeros que darán lugar a las protofibrillas y a las placas de β A (Larson and Lesne, 2012).

Se han identificado numerosas enzimas que pueden estar implicadas en la degradación del péptido β A en el cerebro. Algunas de ellas degradan el péptido en estado monomérico, otras lo hacen en su estado oligomérico y algunas otras lo hacen en el estado más agregado.

Neprelisina: Metalopeptidasa de Zinc que actúa sobre una gran cantidad de sustratos como el glucagón, encefalinas, sustancia P, neurotensina, etc. Es capaz de degradar el β A desde su estado monomérico

hasta el oligomérico. A nivel subcelular la neprelisina se localiza mayoritariamente anclada en la membrana de la superficie celular.

Enzima degradante de insulina (IDE): Es una tiol-metalopeptidasa dependiente de Zinc, capaz de degradar diversos péptidos como la insulina, el glucagón, TGF- α , etc. Degrada el β A en su forma monomérica. A nivel subcelular, se encuentra mayoritariamente como una proteína soluble citosólica, aunque también puede detectarse en la superficie celular y en membranas intracelulares.

Enzima convertidora de endotelina 1 (ECE-1): Es una metaloproteasa homóloga a la neprelisina que es capaz de degradar al β A en su forma monomérica.

Plasmina: Es una serin proteasa, que participa en la fibrinólisis. La plasmina es capaz de degradar el β A desde monómeros hasta formas fibrilares.

Los depósitos extracelulares del β A se dividen en dos grupos principales, placas neuríticas y placas difusas. Las placas neuríticas contienen depósitos extracelulares de proteínas amiloides y se encuentran principalmente de forma filamentosa. Tanto en el interior como alrededor del depósito de amiloide se localizan neuritas distróficas que se encuentran a menudo dilatadas, tortuosas y están marcadas por anomalías ultraestructurales, que incluyen lisosomas alargados, numerosas mitocondrias, y filamentos helicoidales apareados (PHF). Otra característica de las placas neuríticas es que se encuentran íntimamente asociadas con la microglía y la astrogliá.

El tiempo que tarda en formarse una placa neurítica es desconocido, pero estas lesiones probablemente evolucionen gradualmente en el tiempo, durante meses o incluso años. Muchas de las fibrillas de β A encontradas en las placas neuríticas son de β A₁₋₄₂, sin embargo, también están formadas por el β A₁₋₄₀. El diámetro de éstas oscila entre 10-120 μ m y la densidad y el grado de compactación de las fibrillas amiloides que componen el núcleo extracelular muestra gran variación entre placas (Selkoe, 1991a).

4.2. IMPLICACIÓN DEL β A OLIGOMÉRICO

En los últimos años, se ha descrito que son los niveles de las formas solubles del péptido β A las que mejor correlacionan con la severidad de la enfermedad, sugiriendo que las formas solubles podrían tener un papel más importante en la enfermedad que los depósitos.

Los agregados oligoméricos del péptido β A se unen a lugares específicos de la membrana postsináptica induciendo la producción de la proteína Arc y por tanto interfiriendo en la plasticidad sináptica, bloqueando la formación de potenciales de larga duración (LTP) y potenciales de larga depresión (LTD). Asimismo, diversos estudios han mostrado que los agregados oligoméricos desestabilizan la homeostasis del calcio, inducen estrés oxidativo y estimulan la hiperfosforilación de Tau (De Felice et al., 2008). Estos datos señalan la oligomerización del β A como un fenómeno que contribuye a la disfunción neuronal. El mecanismo preciso por el cual los oligómeros ejercen su papel neurotóxico en las neuronas es desconocido y actualmente se está realizando una intensa investigación para elucidar su papel patológico.

Diversos estudios han mostrado los efectos neurotóxicos de los oligómeros solubles (Lublin and Gandy; Selkoe, 2008; Larson and Lesne, 2012), lo que ha hecho pensar que quizá las placas insolubles no sean las que desencadenan las alteraciones patológicas, sino que funcionan como reservorios de las formas oligoméricas. Aunque el papel de β A sea más limitado de lo que se creía en un principio, no hay duda de que es uno de los factores que influyen en la patogénesis de la enfermedad.

4.3. PAPEL PATOLÓGICO DEL β A INTRACELULAR

Varios autores han relacionado la acumulación intracelular del péptido β A con los primeros déficits observados en la patología de EA *in vivo* (LaFerla et al., 2007; Soejima et al., 2013). Diversos trabajos

apoyan este hecho, tal como el desarrollado por Takahashi y col. (2002), quienes detectaron la presencia de βA_{1-42} en la vecindad a la membrana de los cuerpos multivesiculares conteniendo enzimas lisosomales, que pueden ser considerados como endosomas tardíos en pacientes con EA, mediante microscopía electrónica (ME) (Takahashi et al., 2002). El mismo rasgo microscópico fue observado por Langui y col. (2004) en ratones transgénicos PS1xAPP, quienes correlacionaron la acumulación del βA con un incremento en el volumen de los lisosomas en el aparato de Golgi. Además, mediante ME, detectaron epítomos para βA , APP- C terminal, catepsina D, flotilina 1 en el lumen de los cuerpos multivesiculares. Los autores señalan que los cuerpos multivesiculares pueden liberar sus contenidos al espacio extracelular, sugiriendo una asociación de catepsina D con el péptido βA en el espacio extracelular (Langui et al., 2004).

También, se ha reportado que la acumulación del βA en el interior de los cuerpos multivesiculares daña dicha vía a través de la inhibición del sistema proteasoma-ubiquitina (UPS) (Almeida et al., 2006). Estos datos demuestran que la acumulación del βA intraneuronal genera consecuencias patológicas como la inhibición del proteasoma que a su vez produce un aumento de Tau. También se ha observado que la inhibición del proteasoma *in vivo* e *in vitro* favorece la vía amiloidogénica provocando el incremento de los niveles de βA . Estos hallazgos sugieren que el proteasoma participa en la degradación del βA (LaFerla y col., 2007).

Por otro lado, diversos estudios que utilizan ratones transgénicos Tg2576 evidencian la acumulación del péptido βA en el interior de las mitocondrias (Manczak et al., 2006), causando estrés oxidativo a nivel mitocondrial y alterando la homeostasis del calcio. Todo esto induce daños en la cadena transportadora de electrones aumentando la producción de radicales superóxido y la disminución en la producción de ATP (Mattson, 2004). Asimismo, en el modelo “knock-in” desarrollado por Sanofi-Aventis (APPSLPS1K1) se detecta una pérdida masiva de células principales en CA1/2 a partir de los 6 meses de edad relacionado con la presencia intracelular de βA_{1-42} , detectado por tinción con Tioflavina S (Casas et al., 2004).

LaFerla y col (2007), muestran evidencias sobre la implicación del βA intraneuronal en la disfunción sináptica y señalan que esta disfunción puede ser la base de los déficits cognitivos posteriores (LaFerla et al., 2007). En este sentido, el animal triple-transgénico desarrollado por estos autores, muestra la presencia de βA intraneuronal a la edad de 4 meses, correlacionándose con el comienzo de los déficits cognitivos en su modelo animal.

Estudios electrofisiológicos han revelado que aparentemente el βA intraneuronal desencadena un profundo déficit en la formación de los LTP (Oddo et al., 2003a). Diversos estudios realizados en cultivos organotípicos hipocámpales tratados con βA oligomérico, indican que podrían inducir una disminución en la formación de los LTP. Esta disminución puede ser revertida al aumentar la hidrolasa L1 C-terminal de la ubiquitina (de las siglas en inglés UCHL1). Esta hidrolasa es un componente integral del UPS, dicho sistema se encuentra dañado como resultado de la deposición del βA en los cuerpos vesiculares neuronales (Almeida et al., 2006).

βA en la hiperfosforilación de Tau

Los ONF, también descritos por Alzheimer en 1906, son agregados proteicos presentes en el interior de las neuronas, concretamente en el citoplasma de la neurona y en las dendritas proximales. En 1963, la ME permitió observar que los ovillos estaban formados por PHF. Pero no fue hasta 1986 cuando se describió por primera vez su principal componente, la proteína asociada a los microtúbulos Tau (Figura 7) (Grundke-Iqbal et al., 1986).

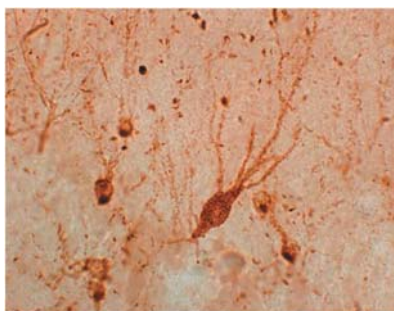


Figura 7. Ovillos neurofibrilares en un paciente de EA, marcados con un anticuerpo específico anti-PHF1 (Bossy-Wetzel et al., 2004)

Tau es una molécula altamente soluble presente en todas las células nucleadas cuya principal función es la estabilización de los microtúbulos, esenciales para el transporte de vesículas y orgánulos entre el soma y las neuritas (Caviston and Holzbaur, 2006). Tau posee abundantes sitios susceptibles de fosforilación, y el balance fosforilación/defosforilación regula sus funciones fisiológicas (Obulesu et al., 2011). Las quinasas que pueden fosforilar *in vivo* esta proteína se dividen en dos grupos; por una parte las quinasas que fosforilan residuos serina o treonina seguidos de prolina (Ser-Pro o Thr-Pro) y por otro lado las que fosforilan serina o treonina no seguidas de prolina. Dentro del primer grupo encontramos la GSK-3 β y Cdk5; y dentro del segundo la proteína quinasa A y la B (PKA y Akt, respectivamente), la quinasa dependiente de calcio/calmodulina II (CaMKII) o la quinasa reguladora de afinidad de microtubulos (MARK) (Johnson et al., 2010). Por otro lado, la principal fosfatasa encargada de la defosforilación de Tau es la proteína fosfatasa 2A (PP2A).

Cuando Tau es anormalmente hiperfosforilada, principalmente en los residuos Ser-Pro o Thr-Pro, pierde su actividad biológica, se disocia de los microtúbulos, se transloca al compartimento somatodendrítico, se hace resistente a la degradación y se inducen cambios conformacionales que la hacen insoluble y finalmente polimeriza hasta formar los PHF, que son el principal componente de los ONF (Meraz-Rios et al., 2010; Metcalfe and Figueiredo-Pereira, 2010).

La deslocalización de Tau altera por lo tanto la función de los microtúbulos, afectando al transporte de vesículas y orgánulos del soma a los axones (Muresan and Muresan, 2009). Las mitocondrias, encargadas del suministro de energía y la homeostasis del calcio, son las principales afectadas, y su depleción en los axones puede ser clave en el proceso de neurodegeneración (Pritchard et al., 2011). Además de la hiperfosforilación, el procesamiento de Tau por caspasas o por calpaínas juega un papel importante en la formación de los PHF, ya que el truncamiento de la proteína favorece la formación de filamentos, tal como se representa en la Figura 8 (Gamblin et al., 2003; Pritchard et al., 2011).

Los ONF no son exclusivos de la EA ya que también pueden encontrarse en la parálisis supranuclear, demencia pugilística, enfermedad de Pick, parkinsonismo postencefálico y demencia frontotemporal (Hardy et al., 2006). Estas lesiones, junto con las lesiones axo-dendríticas, afectan al transporte axonal y por tanto a la funcionalidad sináptica y la viabilidad celular.

Los ONF junto con las placas seniles constituyen los rasgos histopatológicos característicos de la enfermedad y permiten hacer un diagnóstico *post mortem*, sin embargo, al contrario que las placas de amiloide, éstos sí que se correlacionan en número y localización con el grado de severidad de la EA (Giannakopoulos et al., 2003), lo que ha hecho pensar que puedan contribuir a la muerte neuronal (Spires-Jones et al., 2011).

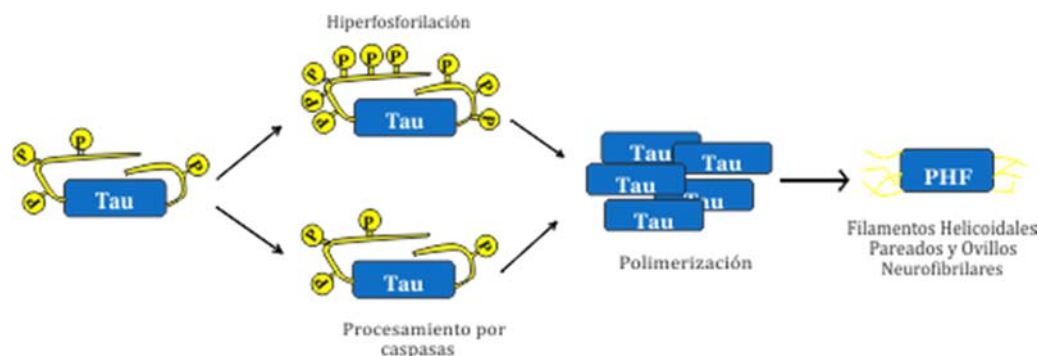


Figura 8. Oligomerización de Tau y formación de ovillos neurofibrilares. (Pritchard et al., 2011).

En este sentido, diversos estudios apoyan la posible implicación de Tau como mediador de la toxicidad inducida por β A (Crimins et al., 2013). Se ha descrito que las neuronas de ratones Tau^{-/-} son resistentes a la degeneración de las neuritas mediada por β A (Rapoport et al., 2002), o que la reducción de los niveles endógenos de Tau de un modelo APP de ratón al cruzarlo con un Tau^{-/-}, mejoraba el déficit cognitivo sin alterar los niveles de β A (Roberson et al., 2007). Aunque estos datos indican que Tau actuaría por debajo de β A, las mutaciones en Tau son la causa de enfermedades neurodegenerativas como la demencia frontotemporal con parkinsonismo asociada al cromosoma 17, en la que no hay patología mediada por β A.

Paralelamente a lo que sucede con las placas de amiloide, la toxicidad de Tau podría estar mediada por las formas no-agregadas, y no por los ONF (Hernandez and Avila, 2008). Se ha establecido un nuevo modelo en el que se observa activación de caspasas previa a la deposición de Tau. Al activarse, las caspasas procesan Tau, y esta polimeriza formando ovillos que también engloban a la proteína completa, lo que indicaría que en lugar de ser una causa, los depósitos de Tau son una consecuencia del proceso neurodegenerativo marcado por la activación de las caspasas. Los autores además indican que las neuronas no mueren inmediatamente tras la activación de las caspasas, ya que la apoptosis no se completa, sugiriendo que los ONF pueden ser un elemento protector (Avila, 2010; de Calignon et al., 2010).

β A y estrés oxidativo

Diversos trabajos relacionan los niveles excesivos de especies reactivas de oxígeno (ROS) con la etiología de la EA (Mattson, 2004; Butterfield et al., 2013; Kosenko et al., 2013). Se ha descrito que tanto el β A oligomérico y diversas preparaciones solubles y/o agregados de los péptidos estimulan la producción de ROS y la peroxidación lipídica además de reducir los niveles del sistema antioxidante en diferentes cultivos de neuronas corticales (Yang and Lung, 2011; Butterfield et al., 2013; Fonseca et al., 2013).

Las formas oligoméricas solubles pueden provocar un incremento del estrés oxidativo alterando el metabolismo celular, provocando una entrada masiva de calcio, originando estrés oxidativo a nivel mitocondrial, provocando la oxidación lipídica que origina aldehídos tóxicos como el aldehído-4-hidroxinonenal (HNE) y la acroleína que modifican las propiedades y funciones de canales, receptores y transportadores de membrana. Estos aldehídos son capaces de estimular la fosforilación de Tau en las células neuronales y por lo tanto hacer que sean más vulnerables a cualquier situación de estrés y finalmente inducen la activación de mecanismos de apoptosis (Mattson, 2004).

Las mitocondrias son el principal centro de actividad metabólica celular, proporcionan ATP a la célula a través del proceso de fosforilación oxidativa, lo que las convierte en grandes productoras de estrés oxidativo. Por ejemplo, el daño oxidativo en la cadena de transporte de electrones puede hacer que este complejo no transfiera los electrones de manera eficaz en el proceso de fosforilación oxidativa,

generando de esta forma más ROS. El resultado es un círculo vicioso en el cual los ROS producen estrés oxidativo que a su vez produce más ROS (Bonda et al., 2010).

Múltiples evidencias apuntan a una disfunción mitocondrial con la edad en enfermedades neurodegenerativas como el EA. Dichas alteraciones se han descrito en cerebro, fibroblastos y células sanguíneas de pacientes, así como en modelos transgénicos de EA (Maruszak and Zekanowski, 2011). Las alteraciones mitocondriales más frecuentes en la enfermedad son las deficiencias en enzimas clave para el metabolismo oxidativo, como el complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa o el complejo piruvato deshidrogenasa, implicados en la reducción del oxígeno molecular (Su et al., 2008; Gibson et al., 2012).

También, se han descrito múltiples mutaciones en el ADN mitocondrial (algunas exclusivas de EA) en pacientes con la enfermedad, que tienen consecuencias funcionales importantes para la mitocondria (Coskun et al., 2004). Debido a la proximidad a la cadena de transporte de electrones, el ADN mitocondrial es más susceptible que el nuclear al daño oxidativo y la tasa de mutaciones es también mayor (Maruszak and Zekanowski, 2011). El incremento de mutaciones funcionales puede conducir a alteraciones en el número, la dinámica y la morfología de las mitocondrias, lo que altera sus funciones, entre ellas las metabólicas provocando daño neuronal (Wang and Youle, 2009). Las alteraciones del metabolismo energético, como la depleción de ATP o la disminución del consumo de glucosa en regiones específicas, también son características importantes de la EA que se asocian a la disfunción mitocondrial (Ferreira et al., 2010; Yao and Brinton, 2011).

El péptido β A ejerce parte de sus efectos neurotóxicos generando estrés oxidativo e induciendo la oxidación de distintas biomoléculas: produce peroxidación de las membranas lipídicas, genera H_2O_2 y HNE en neuronas, además de dañar el ADN e inactivar transportadores como el de la glucosa (Mattson, 2004; Butterfield et al., 2013).

Se ha propuesto que el β A actúa como una metaloenzima (Figura 9) capaz de generar radicales libres por unión a los iones Fe^{3+} y Cu^{2+} mediante los residuos de histidina que presenta su secuencia. La unión a estos metales de transición favorece la agregación del péptido y sus efectos pro-oxidantes (Roberts et al., 2012). De hecho, ambos metales aparecen acumulados en las placas de amiloide. Esta interacción provoca la reducción de los iones, con formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como subproducto. El H_2O_2 es altamente reactivo y difunde a través de la membrana siendo capaz de oxidar lípidos y proteínas intracelulares.

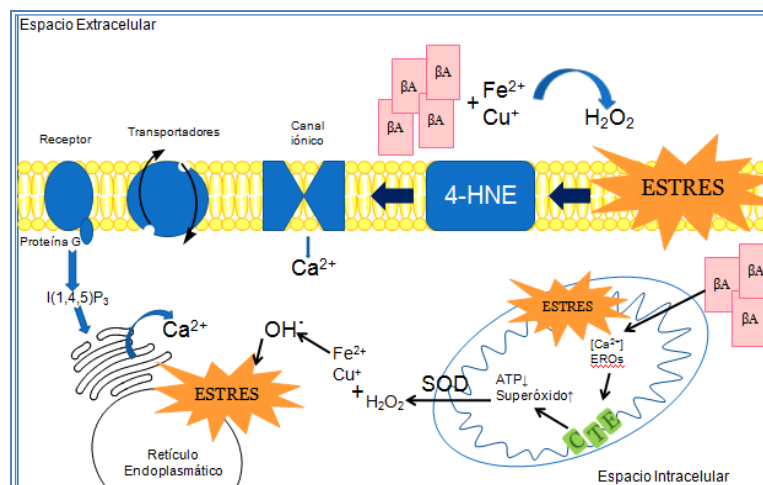


Figura 9. Estrés oxidativo inducido por el β A (Mattson, 2004)

La interacción entre la secuencia de β A-Cu con el H_2O_2 induce la generación del radical libre más reactivo, el radical hidroxilo (OH^\bullet) en la reacción de Fenton, el cual reacciona con lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, provocando modificaciones oxidativas irreversibles y expansivas (Huang et al., 2004).

A su vez, el OH^\cdot reacciona con el βA promoviendo su agregación por formación de enlaces cruzados de di-tirosinas entre péptidos de βA y la subsecuente oligomerización covalente (Atwood et al., 2004). Los agregados de βA podrían interactuar con la membrana celular favoreciendo el ingreso del calcio al medio intracelular e incrementando la producción de ROS (Haughey and Mattson, 2003).

Además, se ha sugerido que el estrés oxidativo promueve la vía amiloidogénica de procesamiento del APP (Komatsu et al., 2007), incrementándose la producción de βA que genera mayor producción de H_2O_2 (Bayer et al., 2006). Todas estas evidencias apoyan fuertemente la teoría amiloidogénica de la EA sugiriendo que la disfunción y degeneración de sinapsis neuronal en la EA podría involucrar el estrés oxidativo inducido por los agregados de βA , que incrementan el daño oxidativo.

El calcio está implicado en una enorme variedad de procesos fisiológicos, muchos de ellos neuronales, como el crecimiento y la diferenciación, la progresión del ciclo celular, la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria; y también en otros fisiopatológicos como la apoptosis y la degeneración (Bezprozvanny, 2009). Desde hace muchos años se ha observado el importante papel de la alteración de la homeostasis del calcio en el envejecimiento y en las enfermedades neurodegenerativas como la EA (Yu et al., 2009).

La concentración de calcio intracelular es menor a la extracelular y, la regulación de su homeostasis se produce por distintos mecanismos. El calcio entra desde el medio extracelular al citosol a través de tres tipos de canales: i) los dependientes de voltaje, que permiten la entrada de calcio tras una despolarización de la membrana; ii) los dependientes de ligando, como los asociados al receptor NMDA de glutamato; o iii) los dependientes de almacenamiento, que se activan por la depleción de los depósitos intracelulares. Además, el RE, el principal almacén de calcio intracelular, puede liberar calcio al citosol a través de los receptores de rianodina (RyR) o de IP3 (Inositol trifosfato).

Las bombas de calcio Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática y las del RE (SERCA) retiran el calcio del citosol y lo transportan en contra de gradiente hacia el exterior celular en el primer caso, y dentro del retículo en el segundo para mantener el equilibrio (Hermes et al., 2010). Los canales de calcio de la mitocondria están menos caracterizados. Existe al menos un intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que libera Ca^{2+} al citosol y un unitransportador y un receptor de rianodina que introducen calcio en la mitocondria (Hoppe, 2010).

Los sistemas de regulación del calcio experimentan alteraciones con el envejecimiento. Las consecuencias son un incremento en los niveles de calcio intracelular, mayor entrada de calcio a través de los canales dependientes de voltaje tipo L, mayor liberación desde el RE a través de los receptores de IP3 y rianodina, disminución de la capacidad tamponadora citosólica y activación de calcineurina y calpaínas (Thibault et al., 2007), proteasas implicadas en la muerte neuronal por apoptosis en la EA (Raynaud and Marcilhac, 2006).

La mitocondria también participa en la homeostasis del calcio ya que sirve de almacén temporal en respuesta a incrementos en la concentración citosólica, por lo que las alteraciones mitocondriales relacionadas con el estrés oxidativo se relacionan también con una disfunción en la regulación del calcio (Yu et al., 2009). Además, si la concentración citosólica de calcio es muy elevada y la captación por la mitocondria es excesiva, se produce un aumento en la producción de ROS, se inhibe la síntesis de ATP y se libera citocromo c dando lugar a apoptosis y muerte celular (Supnet and Bezprozvanny, 2010; Rasola and Bernardi, 2011). El estrés oxidativo en la EA también se relaciona con la disfunción del calcio a través de la peroxidación de las membranas lipídicas. La generación de lípidos neurotóxicos, como el HNE, altera la función de proteínas de membrana implicadas en el transporte iónico como la Ca^{2+} -ATPasa o los canales dependientes de voltaje.

Por su parte, las mutaciones en los genes de las PS pueden alterar directamente la homeostasis del calcio, ya que interactúan con tres componentes clave de su regulación: los receptores de IP3, los de rianodina y las bombas SERCA. Las propias PS, independientemente de su función γ -secretasa,

pueden actuar como canales de calcio de goteo del RE. Las mutaciones en las PS hacen que la proteína pierda esa función y se produzca una sobrecarga de calcio en el RE que puede desencadenar una respuesta apoptótica (Bezprozvanny, 2010). Los productos del metabolismo de APP y β A pueden aumentar la concentración intracelular de calcio actuando sobre los canales o formando poros en la membrana, entre otros mecanismos (Yu et al., 2009).

Además de los reservorios intracelulares, como el RE o la mitocondria, la célula cuenta con moléculas tamponadoras citosólicas que se unen al calcio intracelular, regulan sus niveles y están implicadas en una gran variedad de rutas de señalización (Gilabert, 2012). Entre ellas destacan la calmodulina y la calbindina, cuyas alteraciones también se han descrito en la EA (Riascos et al., 2011).

El calcio media el daño neuronal causado por excitotoxicidad cuando se produce una sobreactivación de los receptores de glutamato. La unión excesiva de glutamato al receptor NMDA conlleva a un aumento del calcio citosólico que puede inducir apoptosis a través de calcineurina o calpaínas, además de alterar otros orgánulos sensibles como las mitocondrias (Dong et al., 2009). En este sentido, la memantina, un antagonista de los receptores NMDA, es un fármaco aprobado para el tratamiento de la EA.

Los lípidos cumplen un papel muy importante en los organismos vivos porque, además de su alto aporte energético, participan en la regulación metabólica (hormonas, vitaminas, prostaglandinas, etc.) y son importantes componentes de las membranas biológicas (fosfolípidos y esteroides). Todas las células, incluyendo las neuronas, están rodeadas por una membrana celular que las separa del medio extracelular. Esta membrana contiene enzimas, canales, receptores y antígenos que juegan un papel vital en la interacción de la célula con otras células, hormonas y otros agentes reguladores del líquido extracelular, pero la estructura básica de estas membranas biológicas es la bicapa lipídica que funciona como una barrera de permeabilidad selectiva. De esta manera, los lípidos regulan los procesos celulares asociados a las membranas biológicas, como por ejemplo el transporte y la comunicación celular, por lo que son esenciales para el normal funcionamiento de estas membranas celulares.

El cerebro posee condiciones que lo hacen particularmente vulnerable al daño oxidativo, tales como i) Altos niveles de lípidos insaturados, ii) Elevado consumo de oxígeno aproximadamente el 15 % del total disponible iii) Concentraciones altas de iones de metales que participan en reacciones redox y iv) Sistemas antioxidantes relativamente pobres.

El péptido β A₁₋₄₂ se puede encontrar en varios estados agregados tales como monómeros, oligómeros, protofibrillas y fibrillas, entre los que la forma oligomérica de β A₁₋₄₂ es considerada la más neurotóxica (Glabe, 2005). El aumento de la toxicidad asociada con β A₁₋₄₂ oligomérico radica en la capacidad que tiene para interactuar con la bicapa fosfolipídica en la que al parecer produce peroxidación de los lípidos de la membrana neuronal. Mark y col. (1997) demostraron que la adición del péptido β A₁₋₄₂ a las neuronas favorecía la formación de HNE (Mark et al., 1997). También existe amplia evidencia experimental de que la metionina en el residuo 35 de β A₁₋₄₂ es particularmente importante para su función oxidativa (Butterfield and Boyd-Kimball, 2005; Butterfield et al., 2007). La metionina puede sufrir oxidación de un electrón para formar un catión radical sulfurililo que posee la capacidad de captar un átomo de H- alílico de las cadenas de acilo insaturadas de moléculas de lípidos, lo que conduce a la iniciación de los procesos de peroxidación de lípidos (Figura 10) (Lauderback et al., 2001; Butterfield et al., 2002).

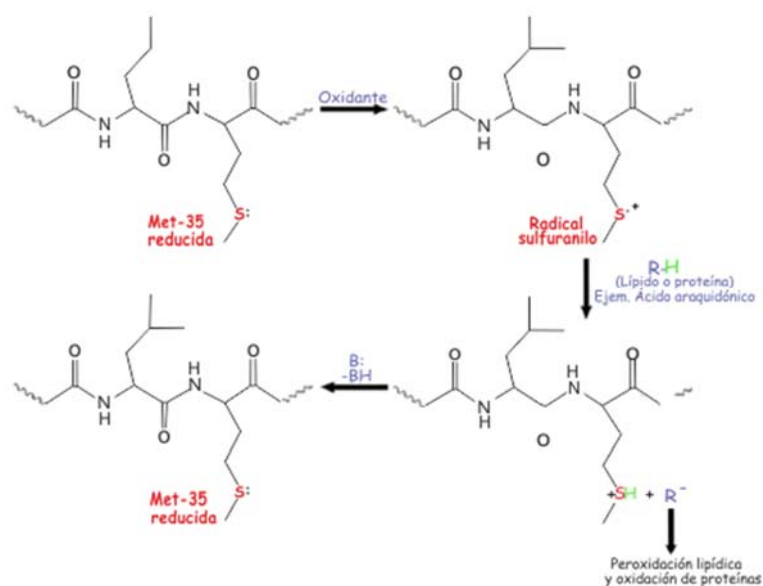


Figura 10. Papel de Met-35 del βA_{1-42} en la peroxidación lipídica (Butterfield et al., 2010)

La peroxidación lipídica produce una pérdida de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de la membrana provocando finalmente la alteración de su estructura, fluidez y permeabilidad. Cuando este fenómeno acontece sobre los fosfolípidos de las lipoproteínas plasmáticas, éstas aumentan significativamente su poder aterogénico. Los antioxidantes pueden formar complejos estables con estos intermediarios oxidantes impidiendo su acción catabólica. Además, dependiendo de su coeficiente de partición y potencial redox, los antioxidantes pueden actuar libremente en la interfase celular comportándose como potentes protectores de células y lipoproteínas o estabilizando antioxidantes lipofílicos que previenen la peroxidación lipídica.

La detección y medida de la peroxidación lipídica ha sido muy utilizada en el estudio de la influencia del estrés oxidativo en distintas patologías como la EA. Para determinar el grado de oxidación lipídica, se puede cuantificar el contenido de malondialdehído (MDA) en suero, orina o muestras de tejido. Pero existen otros metabolitos igualmente válidos que requieren tecnologías más sofisticadas, como es el caso de compuestos volátiles (pentano, etano), 8-2 α -isoprostanos, HNE, acroleína, etc.

La mayoría de estudios que determinan marcadores de peroxidación lipídica en sangre de paciente con EA han encontrado niveles elevados de éstos, con respecto a grupos control (Gustaw-Rothenberg et al., 2010). También diversos autores han valorado los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en cerebros de pacientes con EA y deterioro cognitivo leve (DCL) encontrando niveles elevados con respecto a cerebros sanos (Keller et al., 2005).

La concentración de MDA es una medida de la peroxidación lipídica. En estudios *postmortem* de cerebros de pacientes que habían padecido EA se encontraron concentraciones de MDA significativamente superiores a las que había en el cerebro de individuos de edades semejantes que habían fallecido por otras causas. El MDA por sí mismo se clasifica como nocivo, ya que puede unirse *in vivo* a cadenas de ADN, desencadenando mutaciones.

Algunos estudios han mostrado un incremento de la peroxidación lipídica al encontrar un aumento de MDA en plasma (Gustaw-Rothenberg et al., 2010; Padurariu et al., 2010) y cerebros de pacientes con EA, aunque otros estudios han corroborado el incremento de la peroxidación lipídica con un aumento de otros productos de peroxidación como HNE (Butterfield et al., 2010).

4.4. β A Y RESPUESTA INFLAMATORIA

Existen evidencias de que la neuroinflamación podría ser una de las causas implicadas en el desarrollo de la EA (Hensley, 2010; Li et al., 2011; Obulesu and Jhansilakshmi, 2013), pues se ha observado que la respuesta inflamatoria es local e innata, y aunque en un inicio puede ser beneficiosa, cuando es excesiva o no termina de una manera correcta, se vuelve crónica y puede causar alteraciones neuronales (Hoozemans et al., 2011).

El SNC posee un sistema inmune endógeno que es coordinado por células inmunocompetentes, como son las células de la microglía. La microglía constituye el 10% de las células en el sistema nervioso y representa la respuesta inmune innata en el cerebro, la primera línea de defensa ante estímulos patogénicos (Ransohoff and Brown, 2012). En condiciones patológicas, estas células se activan, migran, rodean las células muertas o dañadas y fagocitan los restos, de manera similar a los macrófagos (Heneka et al., 2010). Tanto la microglía como los astrocitos activados característicos de la EA expresan numerosos mediadores de la inflamación, entre los que se incluyen ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS) que les permiten atacar a los patógenos (Hensley, 2010).

En la EA, se ha observado que se produce activación de la microglía desde etapas tempranas (Cagnin et al., 2001) y numerosos estudios apuntan a que su activación se produce en respuesta a la deposición del péptido β A (Barger and Harmon, 1997; Browne et al., 2013; Wang et al., 2013a). Hensley y col. (2010) reportaron que las placas de amiloide se encuentran asociadas con astrocitos reactivos, microglía activada y marcadores de neuroinflamación (Hensley, 2010). Además, Sastre y col (2008), apoyando esta asociación, describieron que los mediadores de la inflamación pueden incrementar la producción de β A, retroalimentando el ciclo patogénico (Sastre et al., 2008). Sin embargo, se ha postulado que en etapas muy tempranas de la enfermedad, la activación de la microglía puede reducir la acumulación del β A, aumentando su fagocitosis y favoreciendo su degradación (Frautschy et al., 1998).

Por otro lado, diversos trabajos evidencian que las caspasas implicadas en apoptosis como la 8 y 3/7, son capaces de activar la microglía en ausencia de muerte neuronal (Burguillos et al., 2011). La activación de la microglía se desarrolla con un aumento en el número de células y cambios morfológicos, que suponen pasar de la morfología en reposo a una morfología activada caracterizada por presentar un pequeño soma y múltiples ramificaciones (Kettenmann et al., 2011). Además, la activación de la microglía supone la secreción de mediadores de la inflamación como citoquinas, quimioquinas, prostaglandinas, derivados del óxido nítrico (NO), ciclooxigenasa 2 (COX-2) o radicales libres (Kiyota et al., 2009). Precisamente, los pacientes con EA presentan niveles elevados de los mediadores inflamatorios, como IL-1 β , IL-6, TNF- α o TGF- β (Transforming Growth Factor β) y la producción sostenida de estas moléculas pueden contribuir a la activación progresiva de la apoptosis y provocar la muerte de las neuronas (Sastre et al., 2006; Block et al., 2007).

Los astrocitos, que constituyen las células más abundantes de la glía, son células no neuronales del sistema nervioso que proporcionan soporte y protección a las neuronas, regulando su homeostasis (Li et al., 2011). Los astrocitos se activan en respuesta a un daño en un proceso denominado astrogliosis reactiva, que se caracteriza por aumento en la proliferación, cambios morfológicos y elevada expresión de algunas proteínas, como la proteína fibrilar ácida glial (GFAP) que les permiten llegar a la zona dañada (Sofroniew and Vinters, 2010). En casos severos, la astrogliosis reactiva puede acabar formando lo que se conoce como cicatriz glial, una acumulación de astrocitos reactivos rodeados de tejido conjuntivo, que separa las neuronas antes conectadas e impide el restablecimiento de nuevas conexiones neuronales (Sofroniew, 2009). En respuesta a distintos estímulos, los astrocitos reactivos secretan moléculas proinflamatorias y quimioquinas, como IL-1 β , IL-6, TNF- α o TGF, que pueden estar implicadas en los procesos neuroinflamatorios de la EA (Li et al., 2011).

En la EA, los astrocitos suelen aparecer rodeando a las placas de amiloide y formando pequeñas cicatrices alrededor de las mismas que podrían actuar como barreras neuroprotectoras (Sofroniew and Vinters, 2010). Además, son cruciales para la degradación de los depósitos del β A (Wyss-Coray et al., 2003) en un proceso mediado por ApoE, presente de forma muy importante en los astrocitos (Koistinaho et al., 2004). También, existen evidencias genéticas que apoyan el papel de la inflamación en el desarrollo de la enfermedad. Dos recientes estudios han identificado dos genes que podrían favorecer la predisposición a desarrollar EA: CLU y CR1, que codifican clusterina y el receptor 1 del complemento respectivamente, ambos implicados en la cascada de neuroinflamación (Guerreiro and Hardy, 2011).

La cascada de neurodegeneración desencadenada por el β A se representa en la Figura 11. Se ha descrito que a nivel de las células gliales el péptido β A es capaz de inducir la síntesis de NO, ya que favorece la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Además, la iNOS es capaz de activar al receptor CD23 para la liberación de citoquinas como TNF- α e IL-1 β . Además el NO es capaz de difundir rápidamente a las neuronas vecinas inhibiendo la respiración mitocondrial y favoreciendo la liberación de citocromo c oxidasa. El NO también reacciona con el ión superóxido y genera el radical peroxinitrito (ONOO $^-$) el cual provoca daño a nivel de las proteínas, inhibe la respiración celular y activa cascadas de señalización de muerte neuronal. Las citoquinas como TNF- α son capaces de activar directamente la muerte neuronal ya que son capaces de unirse a receptores que estimulan la apoptosis. Se ha descrito que ApoE puede ejercer actividades neurotróficas; sin embargo, el alelo ApoE4 estimula la síntesis de mediadores neuroinflamatorios como IL-1 β retroalimentando la cascada (Spencer et al., 2012).

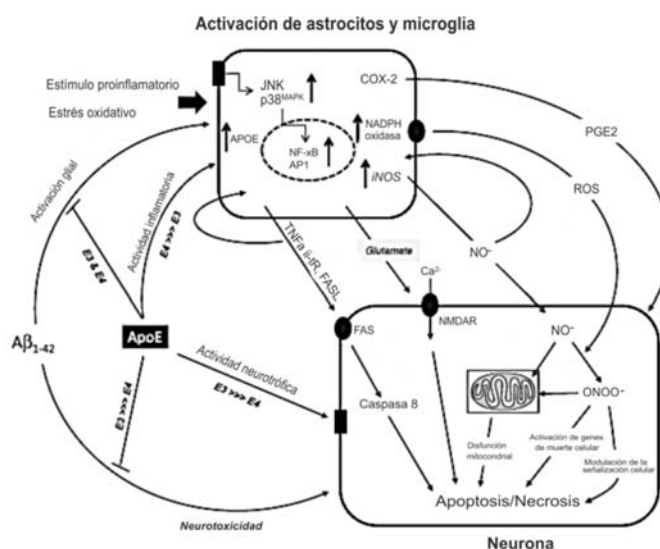


Figura 11. Inducción de neurodegeneración por activación de células gliales en la neuroinflamación. (Spencer et al., 2012).

Los mediadores solubles de la inflamación comprenden una amplia variedad de moléculas de naturaleza proteica y de pequeño tamaño, entre las que podemos encontrar:

Las citoquinas son un grupo de proteínas de bajo peso molecular (por lo general inferior a 30 kDa), genética y estructuralmente diferentes, producidas *de novo* durante la respuesta inmune y de vida muy corta. Se inducen rápidamente en respuesta al daño tisular, infección o inflamación y ejercen acciones muy diversas mediante la unión a receptores de membrana de células dianas, iniciando una cascada de transducción de señales intracelulares que alteran el patrón de expresión génica. Muchas citoquinas son producidas en forma de precursores inactivos y su actividad puede verse regulada a diferentes niveles: transcripción, traducción, procesamiento postraduccion, liberación celular, así como mecanismo de recepción y señalización post-receptor.

En relación a la respuesta inflamatoria, las citoquinas se han clasificado clásicamente en proinflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6) y antiinflamatorias (IL-4, IL-10, TGF- β). Sin embargo, hay que considerar que se trata de una simplificación, ya que la acción de las distintas citoquinas se caracteriza por sus atributos de pleiotropía, redundancia y sinergia, existiendo una superposición entre las funciones de las diferentes citoquinas (Turrin and Plata-Salaman, 2000).

La mayoría de las citoquinas ponen en marcha un proceso de amplificación o ciclo de retroalimentación positiva que conduce a un aumento en su propia producción haciendo que la respuesta producida sea cada vez mayor. Entre las principales citoquinas que participan en los mecanismos de neuroinflamación se encuentran:

Interleucina 1 (IL-1): Pertenece a una familia de tres proteínas estrechamente relacionadas, productos de genes diferentes. Los agonistas IL-1 α e IL-1 β ejercen acciones muy parecidas mediante su unión a receptores en la superficie celular (IL-1RI y II). El tercer miembro de la familia es la IL-1RA, es inhibitoria sobre las otras dos formas actuando como antagonista impidiendo la unión de IL-1 α y β a sus respectivos receptores. La IL-1 puede producir respuestas en células con un bajo número de receptores porque activa una cascada compleja que da lugar a la amplificación de la señal (O'Neill and Dinarello, 2000).

Aunque todas las células residentes en el SNC (astrocitos, neuronas y células del endotelio vascular) pueden expresar IL-1, después de un daño experimental en el SNC, infección o inflamación, la síntesis temprana de la IL-1 tiene lugar fundamentalmente en la microglía (Davies et al., 1999). Se ha descrito que la IL-1 contribuye a la pérdida neuronal en ensayos experimentales agudos y que participa en enfermedades neurodegenerativas crónicas. Así los niveles de IL-1 β y TNF- α aumentan en determinados estados neuropatológicos como la Esclerosis Múltiple, Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), Enfermedad de Parkinson (EP), Epilepsia y EA (Simi et al., 2007).

Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α): Es producido principalmente por macrófagos activados y linfocitos T como una forma precursora de 26 kDa, pro-TNF, que se localiza en la membrana plasmática donde es procesada por una metaloproteasa de matriz extracelular, dando lugar a un heterodímero de 17 kDa soluble (Bradley, 2008).

En el SNC se expresa predominantemente en células gliales, especialmente microglía. Es uno de los mediadores centrales de la respuesta inflamatoria tisular implicado en la patogénesis de numerosas enfermedades neurológicas como la EA, ELA y la EP (Cai et al., 2013). El TNF- α media sus efectos biológicos a través de sus receptores TNFRI (p55 p p60) y TNFFII (p75 o p80), que generan dos vías de señalización completamente diferentes. TNFRI se expresa de forma constitutiva en numerosos tejidos y pertenece a los llamados receptores de muerte, mediando respuestas de muerte por apoptosis. En cuanto a TNFFII, carece de dominio de muerte, típicamente se expresa en las células del sistema inmune y promueve una respuesta pro-supervivencia, está por ello implicado en las vías de reparación tisular y angiogénesis (He et al., 2007; Bradley, 2008).

El TNF- α es un potente estimulador del NF- κ B, que promueve la expresión tanto de factores proinflamatorios, como la COX, y factores prosupervivencia, como el Bcl-2 (Akiyama et al., 2000).

La neurotoxicidad inducida por el TNF- α requiere la participación de otras citoquinas, la generación de ROS y la producción microglial y neuronal de NO a través de la activación de la enzima en su forma inducible iNOS (Weisman et al., 2006).

Interferón gamma (IFN- γ): Homodímero de 34 kDa de peso molecular, es el único representante del grupo de interferones tipo II o inmunes. El IFN- γ es producido por las células T y las células NK (Natural Killers). Además de éstas, los macrófagos y las células B también podrían producir IFN- γ en

determinadas situaciones. La inducción de la producción de IFN- γ en células no-T es activada por citoquinas, especialmente IL-12 sinérgicamente con otras citoquinas (Lieberman and Hunter, 2002).

El IFN- γ posee una función antiviral, aunque los efectos más importantes del IFN- γ parecen ser la activación de los macrófagos, células presentadoras de antígeno (APCs) y células NK, así como la inhibición de células T-colaboradoras (Th2), dando lugar a una respuesta celular mediada por Th1 (Schroder et al., 2004). Además promueve la vía clásica de activación de la microglía y la liberación de factores citotóxicos (TNF- α), pudiendo estar implicado en enfermedades neurodegenerativas como la EA (Browne et al., 2013).

Óxido nítrico (NO): Es un gas bioactivo implicado en diversos procesos fisiológicos y patológicos en distintos órganos y sistemas. Se sintetiza a partir de L-arginina gracias a la NOS, que posee varias isoformas: nNOS (neuronal) y eNOS (endotelial), ambas constitutivas y dependientes de calcio, e iNOS (inducible), independiente de calcio, que se expresa en varios tipos celulares entre los que se encuentran la astrogliá y microglía.

En general, bajas concentraciones de NO promueven la supervivencia y proliferación celular, mientras que niveles más altos favorecen la parada del ciclo celular, la apoptosis y la senescencia (Thomas y col 2008). Aunque el NO funciona generalmente, como neurotransmisor y como vasodilatador, el NO producido por la iNOS es citotóxico y está implicado en la patogénesis de algunas enfermedades neurodegenerativas (Hensley, 2010).

El NO derivado de las células gliales activadas parece contribuir a la degeneración de los oligodendrocitos en enfermedades desmielinizantes y la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas como la EA, EP, Enfermedad de Huntington (EH) y demencia asociada a VIH. Los estímulos que inducen la expresión de iNOS en las células gliales comprenden productos bacterianos como el lipopolisacárido (LPS) o el ADN bacteriano y una variedad de citoquinas. Algunas de estas citoquinas como IL-1 β e IFN- γ , pueden inducir por si solas iNOS en las células gliales. Otras citoquinas, como TNF- α , inducen iNOS en asociación con IL-1 β e IFN- γ . Además, células del sistema inmune que atraviesan BHE (principalmente linfocitos T, pueden inducir la expresión de iNOS en células gliales estableciendo contactos con las mismas.

La regulación de la expresión de iNOS se produce principalmente a nivel transcripcional, donde intervienen factores de transcripción como NF- κ B y CREB, además de otras vías de señalización como la de las quinasas JAK-STAT.

5. MECANISMOS MOLECULARES DE MUERTE NEURONAL EN LA EA

Los tres principales mecanismos de muerte neuronal son la necrosis, la apoptosis y la autofagia. Mientras que la necrosis es un tipo de muerte aguda y no programada, caracterizada por lisis celular e inflamación causada por la liberación de los componentes celulares al medio extracelular, la apoptosis y la autofagia son mecanismos controlados y programados de muerte celular.

5.1. APOPTOSIS

Numerosas investigaciones apuntan a la apoptosis como el principal mecanismo de muerte neuronal en la EA. Morfológicamente, la apoptosis se caracteriza por la condensación de la cromatina, la disminución del tamaño nuclear, la compactación del citoplasma y la fragmentación del ADN que da lugar a los cuerpos apoptóticos que son finalmente fagocitados sin signos de lisis ni inflamación (Lee et al., 2012a).

Bioquímicamente, la apoptosis está asociada a la activación de las caspasas, una familia de proteasas capaces de procesar una gran variedad de sustratos para finalmente dar lugar a la muerte celular. La familia de las caspasas está formada en mamíferos por 13 miembros, de los cuales algunos

tienen funciones relacionadas con la apoptosis, mientras que otras son caspasas proinflamatorias (Martinon y Tschopp, 2007). Dentro de las que tienen función apoptótica, se pueden clasificar en caspasas iniciadoras (caspasa-8, -9 y -10) o efectoras (caspasas -3, -6 y -7) (Pop y Salvesen, 2009). La activación de las caspasas está altamente regulada, por lo que se sintetizan como precursores en forma de procaspasas que necesitan ser activadas. Las caspasas iniciadoras se activan por dimerización y activan a su vez a las caspasas efectoras por proteólisis.

El proceso apoptótico se puede iniciar por dos vías bien definidas, la extrínseca y la intrínseca. La vía extrínseca está asociada a señales del medio extracelular recibidas a través de los receptores de muerte, mientras que la vía intrínseca actúa en respuesta a estímulos como daño en el ADN, radiación UV (Wang y Youle, 2009) y se inicia cuando se producen cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial.

La disfunción mitocondrial conduce a la alteración en el almacenamiento de calcio, generación de ROS y activación de NOS y modificación de la permeabilidad mitocondrial. La disfunción mitocondrial persistente altera el equilibrio energético mitocondrial y contribuye a la muerte neuronal a través de la liberación de citocromo c y otros factores proapoptóticos al citosol y, en última instancia, a la activación de caspasa 3 (Higgins et al., 2010). La activación de caspasa 3 puede contribuir a la neurodegeneración crónica a través de apoptosis mediante la eliminación de las neuronas que se han acumulado en agregados tóxicos (Figura 12). Por otra parte, la caspasa 3 puede desactivar las funciones de proteínas antiapoptóticas, alterando la protección de las neuronas y provocando muerte por apoptosis (D'Amelio et al., 2012).

Numerosos hallazgos apoyan el papel de la apoptosis en la muerte neuronal en la EA, entre ellos el incremento de caspasas activas en el cerebro de pacientes, principalmente de caspasa 3 (Zhang et al., 2011). También se han detectado otras caspasas activas como caspasa 6 (Graham et al., 2011), caspasa 8 (Matsui et al., 2006) y caspasa 9 (Rohn et al., 2002; Pompl et al., 2003). Asimismo, se ha reportado la implicación de las caspasas en el procesamiento de Tau. Se ha descrito que la caspasa 3 hidroliza Tau a nivel de la posición 421 para liberar una forma truncada de la proteína que se puede encontrar en los ONF característicos de la EA (Figura 12a) (Hyman and Yuan, 2012; Lee and Shea, 2012). En la Figura 12b, se muestra una sección cerebral de un paciente con la EA en la que se utilizó un anticuerpo específico para el epítipo Tau Asp421 con la finalidad de identificar la presencia de estos fragmentos procesados por caspasa 3 en los agregados observados.

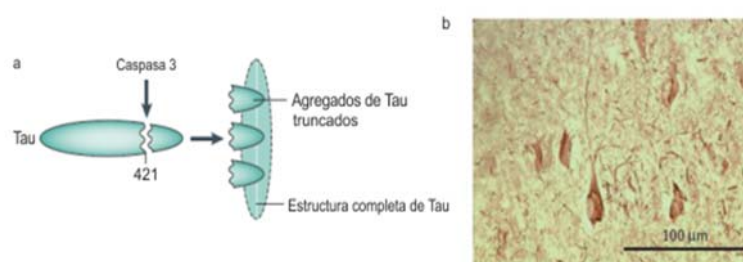


Figura 12. Actividad de caspasa 3 sobre Tau y su participación en la formación de ovillos neurofibrilares. (Hyman and Yuan, 2012)

En modelos experimentales, se ha sugerido que la activación de las caspasas precede a la formación de los ONF, tal vez mediante la generación de este fragmento truncado de Tau, que es propenso a formar agregados (Hyman y Yuan 2012). También, APP puede ser sustrato de las caspasas, contribuir a la formación de β A y generar péptidos neurotóxicos como C31 o Jcasp. Por otro lado, se ha descrito que el péptido β A es capaz de activar caspasas favoreciendo la cascada neurodegenerativa (Zhang et al., 2011).

D'Amelio y col. (2012) propusieron un modelo para explicar la implicación del péptido β A en la pérdida de sinapsis nerviosas (Figura 13), en el cual describen que la acumulación del β A en las dendritas

provoca estrés mitocondrial, liberación del citocromo c, formación del apoptosoma y activación de caspasa 3. La caspasa 3 también podría estar implicada en la activación de GSK-3 β que favorece la fosforilación de Tau, promoviendo la formación de los ONF, lo que contribuye a la degeneración sináptica (D'Amelio, Sheng et al. 2012).

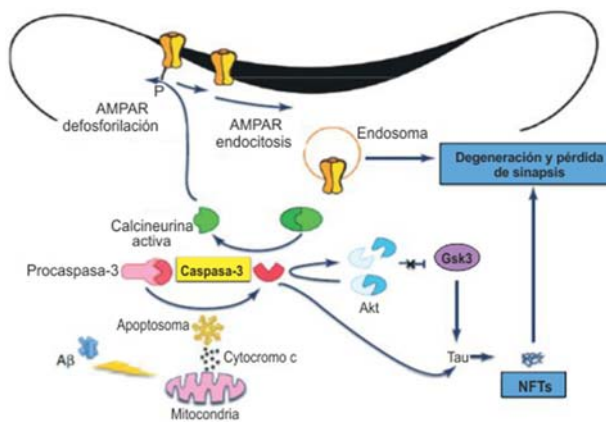


Figure 13. Implicación del péptido β A en la pérdida de sinapsis nerviosas (D'Amelio et al., 2012).

Algunos autores han planteado que el proceso de muerte neuronal en la EA no se corresponde con el proceso apoptótico tradicional. La hipótesis se basa en que las células en cultivo emplean alrededor de 24 horas en completar el proceso, algo que contrasta con una enfermedad crónica como la EA (Jellinger, 2006). Además, el hecho de que en las neuronas no se encuentren eventos terminales del proceso, como condensación de cromatina o cuerpos apoptóticos, pero que si aparecen signos tempranos de apoptosis como activación de caspasas iniciadoras o fragmentación del ADN (Nunomura and Chiba, 2000). Una vez iniciada la apoptosis, ésta no se completa, sino que se evita o al menos retrasa, un proceso que Raina y cols. denominaron abortosis (Raina et al., 2003). Este sería un mecanismo de supervivencia de las neuronas ante el ambiente proapoptótico en el que se encuentran, favorecido por la elevada presencia de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, rasgo característico en neuronas de pacientes que padecen la EA (Rohn and Head, 2008).

5.2. AUTOFAGIA

El proceso de autofagia es un mecanismo por el cual algunas proteínas, agregados proteicos y orgánulos son degradados por la célula en los lisosomas. Los objetivos son dos: emplear estos sustratos como fuente de energía para la síntesis de nuevas macromoléculas y deshacerse de estructuras perjudiciales para la célula (Mizushima and Klionsky, 2007). Existen tres subtipos de autofagia: macroautofagia, microautofagia y la mediada por chaperonas (Figura 14).

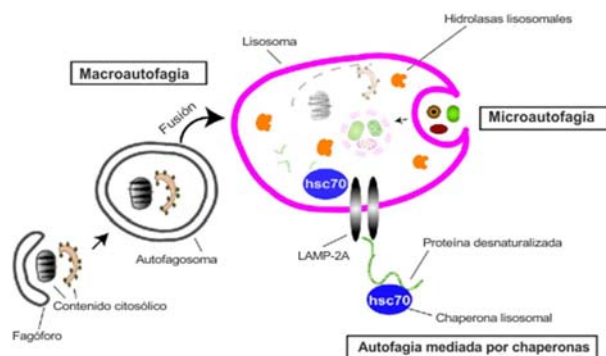


Figura 14. Subtipos de autofagia que participan en la degradación de proteínas y componentes citosólicos celulares (Pallauf and Rimbach, 2013).

En la macroautofagia, regiones enteras del citosol englobando orgánulos, agregados proteicos o proteínas mal plegadas entre otros, quedan secuestradas en una vacuola de doble membrana, denominada autofagosoma, que posteriormente se fusiona con el lisosoma. En la microautofagia también se procesan regiones enteras del citosol, pero es la propia membrana lisosomal la que se invagina para captar los componentes citosólicos. La autofagia mediada por chaperonas como hsc70 degrada selectivamente proteínas que presentan una secuencia de aminoácidos concreta que éstas reconocen mediante el receptor LAMP-2A (lysosome-associated membrane protein type 2A) (Pallauf and Rimbach, 2013).

Fisiológicamente, existe un nivel basal de autofagia responsable del correcto recambio de proteínas y orgánulos, que es muy importante, sobre todo en células quiescentes como las neuronas, ya que les permite deshacerse de proteínas citosólicas aberrantes cuya acumulación podría conducir a la muerte neuronal. Sin embargo, aunque la autofagia puede actuar como protector frente a estímulos agresivos, también puede convertirse en un mecanismo de muerte neuronal.

Las alteraciones de la autofagia relacionadas con la edad podrían contribuir al desarrollo patológico de enfermedades neurodegenerativas. La muerte celular por autofagia se caracteriza por la ausencia de condensación de cromatina y la presencia de numerosas vacuolas en el citoplasma (Amelio et al., 2011). En los pacientes con EA, se ha descrito la acumulación de autofagosomas disfuncionales en neuronas y neuritas distróficas (Boland et al., 2008; Scheper et al., 2011) que se han relacionado con la presencia de βA_{1-42} y con el deterioro del sistema lisosomal con la edad. Este elevado número de vacuolas disfuncionales podrían conducir a la muerte neuronal porque la célula no podría hacer frente a la degradación de la gran cantidad de contenido citoplasmático acumulado en las mismas o por daños en la membrana de los autofagosomas que liberarían su contenido al citoplasma (Amelio et al., 2011; Soura et al., 2012).

6. MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

La vida en presencia del oxígeno molecular exige contar con una batería múltiple de defensa contra las ROS y/o RNS que, por un lado tiendan a impedir su formación y, por otro los neutralicen una vez formados. Los seres vivos poseen un conjunto de sistemas fisiológicos que se encargan de eliminar estas especies reactivas, ocupándose de mantener el estado de equilibrio que existe entre sustancias oxidantes y antioxidantes. Estos sistemas comienzan por reducir el oxígeno y son los llamados antioxidantes.

Un antioxidante es cualquier sustancia que cuando está presente a bajas concentraciones en presencia de un sustrato oxidable, retrasa o previene la oxidación del mismo. La salud del organismo depende en gran medida de sistemas de defensa antioxidante que actúan frente al daño producido por especies radicalarias.

En condiciones fisiológicas la concentración de antioxidantes es varios órdenes de magnitud superior a la concentración de ROS. A pesar de esto, la formación de ROS tiene lugar de forma continua pero controlada. El problema para nuestra salud se produce cuando nuestro organismo tiene que soportar un exceso de radicales libres durante años, producidos principalmente por contaminantes externos que penetran en nuestro organismo, y en el caso de la EA por el estrés oxidativo desencadenado por la acumulación del βA .

Las ROS se pueden producir tanto en medios acuosos como lipídicos y dentro o fuera de las células. Por ello para minimizar sus efectos dañinos existen antioxidantes hidrosolubles y liposolubles, intra- y extracelulares, lo que refleja la enorme importancia de estos mecanismos de defensa antioxidante frente a la oxidación.

Las ROS pueden ser eliminadas mediante sistemas conformados por pequeñas moléculas enzimáticas y no enzimáticas. Es lo que se denomina defensa primaria contra el daño oxidativo. Como

regla general, la mayor concentración de antioxidantes enzimáticos es intracelular (aunque también poseen localización extracelular algunas enzimas como la superóxido dismutasa y algunas peroxidasas), mientras que la mayor concentración de la mayoría de antioxidantes no enzimáticos se encuentra en el líquido extracelular. En la tabla 2 se muestra una clasificación de los antioxidantes según el sitio donde ejercen su acción.

Tabla 2. Clasificación de los antioxidantes según el sitio donde ejercen su acción.

Intracelular	Membrana	Extracelular
Superóxido Dismutasa	Vitamina E	Ceruloplasmina
Glutation Peroxidasa	Vitamina A	Transferrina
Glutation reductasa	β -caroteno	Ácido úrico
	Glutation Peroxidasa	Vitamina E
	Glutation Reductasa	Superóxido Dismutasa
		Glutation Peroxidasa
		Glutation reductasa

Los antioxidantes pueden ser exógenos o endógenos según su procedencia. Los primeros son aportados principalmente por los alimentos, mientras que los endógenos son producidos por el mismo organismo como un mecanismo de defensa intrínseco.

Los antioxidantes también se pueden clasificar en función de su mecanismo de acción: i) Antioxidantes de prevención, ii) Antioxidantes eliminadores de radicales libres (radical scavenger) y iii) Sistemas enzimáticos de reparación o de síntesis *de novo*.

6.1. SISTEMAS ENZIMÁTICOS

La función de los antioxidantes enzimáticos es prevenir la iniciación de las oxidaciones en cadena, reduciendo las especies radicalarias como radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y H_2O_2 a moléculas más estables, agua y oxígeno, al mismo tiempo que se evita la interacción entre las anteriores con metales de transición y así evitar la formación de la especie oxigenada más reactiva, el radical OH^{\cdot} (Figura 15). A grandes rasgos se caracterizan por utilizar iones metálicos (Fe, Zn, Cu, Mn y Se) como cofactores o coenzimas esenciales.

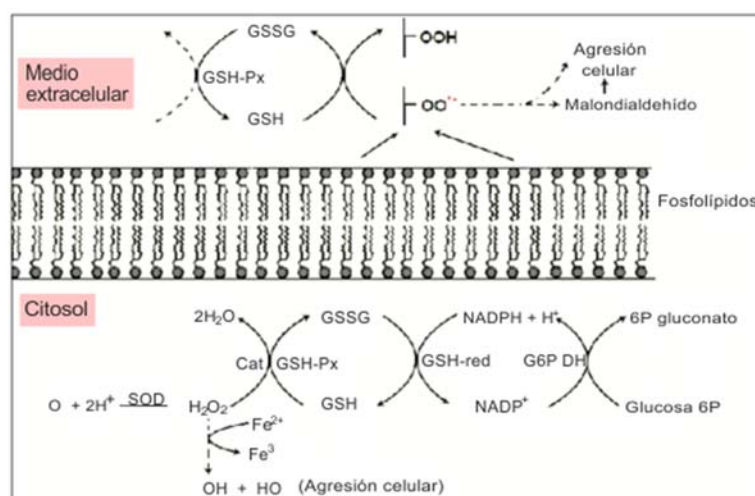


Figura 15. Principales sistemas antioxidantes del organismo.

Superóxido dismutasa (SOD)

Pertenecen a la familia de las metaloenzimas y se encuentran distribuidas en todos los organismos aeróbicos. Juegan un papel importante en el control de los niveles de $O_2^{\cdot-}$ en los compartimentos celulares ya que es capaz de acelerar la dismutación espontánea del $O_2^{\cdot-}$ hacia H_2O_2 y O_2 .

Se aislaron por primera vez en 1939, por Man y Keilin a partir de los eritrocitos bovinos, aunque en este primer aislamiento no se asoció a ninguna actividad enzimática, siendo denominada hemocupreína por contener cobre. Posteriormente, McCord y Fridovich, en 1969, mostraron su capacidad enzimática para inhibir la oxidación de ferrocitocromo C por eliminación de $O_2^{\cdot-}$, siendo renombrada como superóxido dismutasa (McCord and Fridovich, 1969).

Hoy en día, se pueden localizar en mamíferos tres grandes familias separadas en base a los metales que contienen y/o su localización en la célula. Dos familias son intracelulares, las superóxido dismutasas cobre, zinc-dependientes (Cu,Zn-SOD o SOD1) y las manganeso dependientes (Mn-SOD o SOD2), y las superóxido dismutasas del espacio extracelular (Ec-SOD o SOD3).

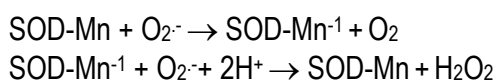
Las Cu,Zn-SOD, presentan un peso molecular de 32 kDa, estando constituidas por dos subunidades idénticas, con un átomo de cobre y otro de zinc cada una. De estos dos metales, el Cu es el que presenta la actividad catalítica, localizándose en el sitio activo de la enzima, mientras que el Zn desempeña una función básicamente estructural. Esta familia se localiza principalmente en el citosol de la célula y el gen que la codifica se encuentra en el cromosoma humano 21.

Las Mn-SOD están constituidas por cuatro subunidades idénticas, con un átomo de Mn por unidad. Su peso molecular es de 80 kDa y su localización es primordialmente mitocondrial. El gen que la codifica se localiza en el cromosoma 6 humano.

La Ec-SOD fue descubierta en tejido pulmonar. Es un tetrámero de 135 kDa que contiene un átomo de cobre por subunidad. Su gen se localiza en el cromosoma 4 humano. Esta SOD presenta menor actividad que las intracelulares.

Las SOD están ampliamente distribuidas en todos los tejidos, salvo la Mn-SOD que no se localiza en eritrocitos. En humanos, las Cu,Zn-SOD, presentan mayor actividad en hígado y sustancia blanca del cerebro, y las Mn-SOD en hígado, corazón y páncreas. Las Ec-SOD son más activas en el espacio extracelular del útero, glándulas tiroideas y páncreas.

El mecanismo general de actuación de las SOD se muestra en la siguiente ecuación:



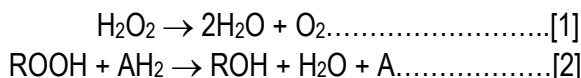
Es interesante la posible participación de las Cu,Zn-SOD en relación a las especies reactivas de oxígeno en la EA que desarrollan los pacientes con síndrome de Down. En este caso, ocurre una sobreproducción de SOD, ya que el gen que la codifica se encuentra en el cromosoma 21. Dicha sobreproducción no se encuentra acompañada de un incremento de glutatión peroxidasa ni de catalasa, lo que conlleva a un aumento de la producción de H_2O_2 , con los consecuentes efectos tóxicos (de Haan et al., 2003).

Catalasa (CAT)

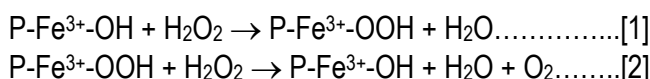
Fue una de las primeras enzimas antioxidantes descritas. Se halla prácticamente en todas las células de animales y plantas (Deisseroth y Douce 1970). Se trata de una enzima intracelular ferriporfirínica, localizada principalmente en peroxisomas (80%) y en el citosol (20%). Se encuentra constituida por 4 subunidades, cada una con un grupo hemo enlazado en su centro activo.

La función de la catalasa es doble, ya que cataliza tanto la descomposición de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno [1] (actividad catalítica), como la oxidación de donadores de hidrógeno,

como pueden ser metanol, etanol, fenoles, etc., con el consumo de 1 mol de peróxidos [2] (actividad peroxidante). Dentro de los peróxidos consumidos se encuentra el H_2O_2 y los hidroperóxidos de alquilo, siendo en este caso la reactividad de la catalasa inversa a la longitud de la cadena.



El que predomine la reacción [1] o la reacción [2] va a depender de la concentración de donadores de hidrógeno y de la concentración o producción de H_2O_2 en el sistema. Se ha observado que la descomposición de H_2O_2 es muy rápida, mientras que las reacciones peroxidantes son relativamente lentas. En ambas reacciones, lo primero en formarse es un complejo primario entre H_2O_2 o el hidroperóxido y el hierro del grupo prostético [1], dando lugar a la formación del complejo activo I, el cual reacciona con otra molécula de hidroperóxido para dar finalmente agua y oxígeno [2].



La CAT presenta una baja afinidad por el H_2O_2 , es decir necesita altas concentraciones del mismo para poder trabajar rápido, aunque se ha observado una rápida inactivación de la actividad de CAT a concentraciones de H_2O_2 superiores a 0,1 M por formación de los complejos inactivos II y III. También se ha observado la inactivación de CAT por el O_2^- .

La concentración de esta enzima es distinta en los diferentes órganos o compartimentos. Así, en plasma su concentración es bastante baja, encontrándose prácticamente ausente en cerebro, aunque su actividad puede ser inducida por el factor de crecimiento nervioso, siendo muy activa en hígado y eritrocitos. Además, se ha observado que puede ser liberada por células necrosadas, autolimitando la extensión del daño por radicales libres.

Glutation peroxidasa (GPx)

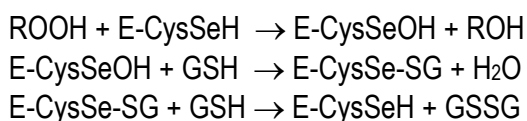
Las GPx constituyen un conjunto de enzimas que catalizan la reacción de hidroperóxidos con el glutatión reducido (GSH), dando lugar a la formación de glutatión oxidado (GSSG) y el producto de reducción de hidroperóxidos:



El radical R puede ser cualquier grupo orgánico, aromático o alifático, o simplemente hidrógeno, siendo en este caso el sustrato ROOH.

En los organismos vivos se encuentran dos grandes grupos, las GPx selenio dependientes (GPx-Se) y las selenio independientes (GPx-no-Se). Las primeras son tetraméricas, conteniendo selenio en forma de enlaces covalentes selenio-cisteína en su centro activo. Son activas frente a hidroperóxidos orgánicos y H_2O_2 , localizándose primordialmente en el citosol (70%) y en menor cantidad en las mitocondrias (30%), en la matriz mitocondrial y en lugares de contacto entre la membrana externa e interna mitocondrial. Estas enzimas en la mayoría de los animales son las responsables de la mayor fracción de actividad peroxidasa.

El mecanismo de acción de las selenio-dependientes sigue el siguiente esquema de reacción:



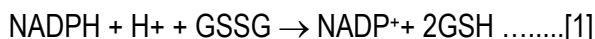
En mamíferos también se ha descrito otro grupo de GPx-Se, que son formas isoenzimáticas, que a diferencia de las anteriores están constituidas por una sola unidad, y actúan sobre hidroperóxidos de fosfolípidos sin necesidad de la actuación de la fosfolipasa A_2 . Son solubles y se localizan en el citosol

mostrando su actividad principalmente a nivel de las membranas. Sin embargo, son menos activas sobre H_2O_2 , presentando igual reactividad frente a hidroperóxidos de ácido linoleico y siendo las únicas activas sobre hidroperóxidos de fosfolípidos.

Las GPx-no-Se no requieren selenio para su actividad catalítica, descomponen sólo hidroperóxidos orgánicos. Se localizan en el citosol, mitocondrias y fracciones celulares que contengan membranas. Esta actividad peroxidasa es llevada a cabo por las glutatión transferasas, las cuales se ha observado que aumentan su actividad peroxidasa, disminuyendo su actividad transferasa, en situaciones de estrés oxidativo; este aumento y cambio de actividad ha sido observado en microsomas hepáticos de rata entre otros órganos y especies.

Glutatión reductasa (GR)

Se trata de una flavoproteína localizada en el citosol y mitocondrias de la mayoría de los tejidos. Actúa catalizando la reducción del fosfato de nicotinamida adenin dinucleótido (NADPH) dependiente del GSSG hacia GSH [1]. A su vez, el NADP^+ se regenera reduciéndose a través de la vía de las pentosas fosfato (glucosa 6P \rightarrow gluconato).



Está constituida por dos subunidades idénticas, presenta un peso molecular de 100 kDa y como grupo prostético a flavín adenín dinucleótido. Su importancia radica en la capacidad de mantener los niveles de GSH, el cual juega un papel importante en el mantenimiento del poder reductor celular.

6.2. SISTEMAS NO ENZIMÁTICOS

En este apartado nos centraremos en el principal antioxidante no enzimático del organismo, el glutatión. Las células presentan diferentes compuestos de defensa antioxidante como la vitamina A, vitamina C, vitamina E, coenzima Q, β -caroteno, y diferentes estudios incluyen a los flavonoides.

Glutatión

El tripéptido glutatión (γ -L glutamyl-L-cisteinylglycine) se encuentra ampliamente distribuido en las células de animales, plantas y microorganismos. Es el compuesto tiólico presente en mayor concentración en todas las células (Meister, 1988). Participa en distintas funciones como la detoxificación de xenobióticos, el mantenimiento de los grupos sulfhidrilo de las proteínas en su estado reducido, como cofactor de varias enzimas y constituye la forma de almacenamiento y transporte de la cisteína en la célula. Sin embargo, su función más importante es la de antioxidante intracelular, desempeñando un papel crucial en la defensa celular frente al estrés oxidativo y nitrosativo.

En su acción antioxidante, el glutatión puede combinarse de forma no enzimática con distintos radicales libres como O_2^- , OH^- y NO , o actuar como donador de electrones en la reducción de peróxidos, en una reacción catalizada por la GPx. En ambos casos, el producto final es el GSSG. El H_2O_2 , el NO y el ONOO- reaccionan con el GSH mayoritariamente (>90%) mediante este mecanismo (Radi et al., 1991). El GSSG así formado es el sustrato de la flavoenzima GR que transfiere electrones del NADPH al GSSG, regenerando de esta forma el GSH. El estado redox celular viene determinado por la relación entre moléculas oxidadas y reducidas en la célula. En condiciones normales, el GSH representa el 98% del glutatión total intracelular. Al ser el glutatión el antioxidante mayoritario, incluso la oxidación de una pequeña cantidad de GSH a GSSG puede producir importantes cambios en el estado redox celular.

La concentración intracelular de GSH es un factor determinante de la vulnerabilidad neuronal al ONOO- (Radi et al., 1991; Bolanos et al., 1995; Brito et al., 2006). De hecho, la concentración intracelular de GSH disminuye drásticamente cuando las neuronas se exponen a ONOO- endógeno o exógeno (Brito et al., 2006). Es más, el ONOO- únicamente provoca daño mitocondrial y la muerte celular en los

astrocitos cuando en éstos disminuye drásticamente las concentraciones intracelulares de GSH (Barker et al., 1996). En este sentido, es importante resaltar que los astrocitos disponen de una alta concentración intracelular de antioxidantes, como el GSH y vitamina E, que no poseen las neuronas, diferencia que puede explicar, al menos en parte, la resistencia de los astrocitos frente a la citotoxicidad del ONOO-. Por otro lado, la activación del ciclo de las pentosas fosfato por H_2O_2 o por el ONOO- incrementa la disponibilidad de NADPH, necesario para la regeneración de GSH a partir de GSSG.

6.3. SISTEMAS DE DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS Y EA

Los dos principales sistemas proteolíticos responsables del recambio de las proteínas celulares son el sistema lisosomal y el proteasoma (Figura 16). Además de estos dos, la mitocondria tiene su propio sistema proteolítico.

El sistema lisosomal es el responsable de la degradación del 10% de las proteínas celulares, principalmente proteínas extracelulares o de la superficie celular, orgánulos y regiones completas de citosol en respuesta a cambios en las condiciones ambientales y a diferentes agentes estresantes (Ciechanover, 2005).

El proteasoma es un complejo enzimático multicatalítico de gran tamaño presente en el citosol, en la cara citosólica de la membrana plasmática y en el núcleo. Se estima que el proteasoma es el responsable de la degradación del 80-90% de las proteínas celulares incluyendo reguladores del ciclo celular, factores de transcripción, oncogenes y genes supresores de tumores, proteínas anormales o dañadas, e incluso tiene un papel central en la proteólisis selectiva de antígenos para su presentación con las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I (MHC-I). De ahí su importancia en un gran número de procesos celulares. Por tanto, el proteasoma puede ser entendido como un gran centro de procesamiento y reciclaje de proteínas celulares (Ciechanover, 1998).

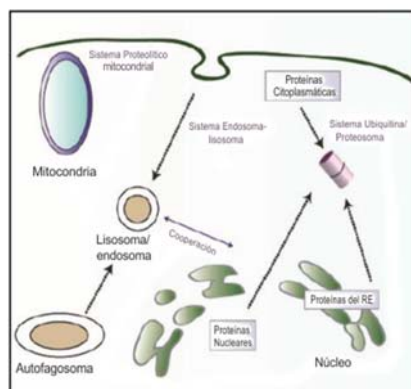


Figura 16. Principales sistemas proteolíticos celulares.

El proteasoma está formado por un núcleo catalítico (proteasoma 20S) que correspondería a la mínima unidad funcional, y varios tipos de subunidades reguladores que dan lugar a diferentes clases de proteasomas.

Proteasoma 20S

Es un complejo multimérico de unos 700 kDa, formado por cuatro anillos heptaméricos. Los dos anillos externos están compuestos por siete proteínas que se denominan subunidades α , mientras que los dos anillos internos los forman siete proteínas denominadas subunidades β (Figura 17). En procariotas, tanto las subunidades α como las β son idénticas, sin embargo, en eucariotas las secuencias se han diversificado en 7 subunidades α y 7 subunidades β diferentes, codificadas por 14 genes distintos (Volker y col 2002).

Este complejo puede dividirse en tres cámaras: la cámara interna o catalítica, formada por la región de unión de los dos anillos beta, y dos antecámaras externas formadas por la región de unión de un anillo alfa y uno beta, que se aseguran que sólo proteínas desplegadas puedan entrar a la cámara central catalítica (Groll y col. 1997).

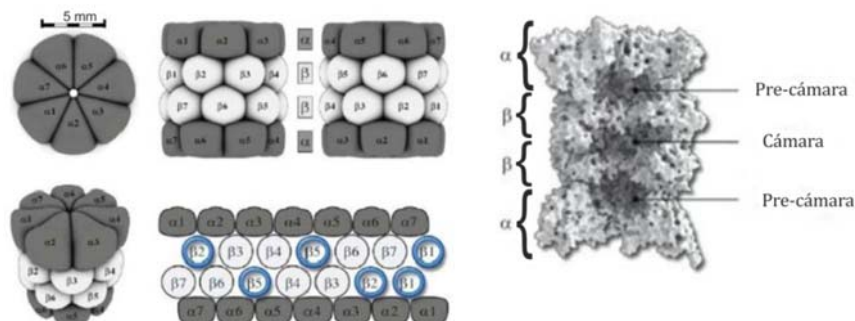


Figura 17. Estructura del complejo 20S. (Jung et al., 2009)

De todas las subunidades que forman el proteasoma 20S, sólo tres son proteolíticamente activas en el proteasoma maduro, siendo responsables de las actividades catalíticas del mismo:

- $\beta 1$ hidroliza preferentemente enlaces peptídicos en el extremo carboxilo de aminoácidos ácidos (actividad PGPH o *peptidylglutamyl-peptide hydrolysing activity*).
- $\beta 2$ hidroliza preferentemente enlaces peptídicos en el extremo carboxilo terminal de aminoácidos básicos (actividad T-L o *trypsin-like activity*).
- $\beta 5$ hidroliza preferentemente enlaces peptídicos en el extremo carboxilo de aminoácidos hidrofóbicos (actividad CT-L o *chymotrypsin-like activity*).

Estudios genéticos han establecido un orden de importancia entre las diferentes actividades catalíticas del proteasoma, siendo la actividad CT-L la más importante, seguida de la actividad T-L y por último la PGPH. Este orden se sustenta en el hecho de que dobles mutantes $\beta 5/\beta 1$ y $\beta 2/\beta 1$ son viables mientras que $\beta 5/\beta 2$ no lo son (Heinemeyer et al., 2004). El mecanismo proteolítico del proteasoma consiste en un ataque nucleofílico llevado a cabo por el grupo hidroxilo (-OH) de una treonina N-terminal presente en las tres subunidades catalíticas β (Figura 18).

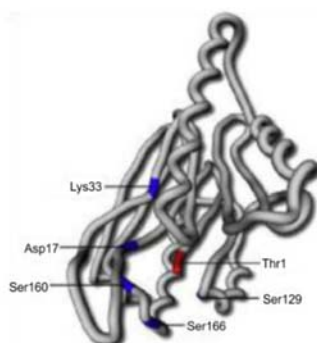


Figura 18. Estructura de una subunidades β del proteasoma. La treonina N-terminal constituye el grupo activo en el centro proteolítico de la subunidad β y está marcado en rojo (Jung et al., 2009).

La puerta central formada por las subunidades α está normalmente cerrada por el extremo N-terminal de las siete subunidades α , lo que mantiene al proteasoma en un estado proteolíticamente inactivo (Groll y col. 2000). Para ello, el extremo N-terminal de la subunidad $\alpha 3$ interacciona con residuos conservados en las otras subunidades. La delección del extremo N-terminal de la subunidad $\alpha 3$ tiene como consecuencia la apertura del barril y la facilitación del acceso a los sustratos.

La degradación de proteínas se hace de forma progresiva, dando lugar a péptidos de 3 a 20 residuos, con una longitud media de 8 a 9 residuos, que son posteriormente degradados en su totalidad por peptidasas citosólicas (Groll, y col 1997; Heneymer y col 1997). La principal función del proteasoma 20S es la degradación de proteínas oxidadas en un proceso que no requiere ATP (Davies, 2004).

El barril catalítico que forma el proteasoma 20S se encuentra normalmente cerrado y puede abrirse y pasar a una forma activa, bajo diversas condiciones (tratamiento con calor, adición de detergentes a bajas concentraciones, etc.). Sin embargo, la apertura de los anillos α también puede inducirse mediante la unión de complejos reguladores como son: PA700 (19S) o PA 28 (11S).

Proteasoma 26S

Se forma por la unión de dos complejos reguladores 19S o PA700 al núcleo 20S (Glickman et al., 1998). La principal función del proteasoma 26S en la degradación de proteínas que han sido previamente marcadas con ubiquitina, aunque también puede degradar otras proteínas no ubiquitinadas. El complejo 19S (o PA700), formado por 18 subunidades puede dividirse a su vez en dos partes denominadas base y tapadera (Glickman et al., 1999). La base está compuesta por 8 subunidades, seis de las cuales tienen actividad ATPasa (Rpt 1-6) y pertenecen a la familia AAA (*ATPases associated with a variety of celular activities*). Estas serían las responsables del desplegamiento de las proteínas, necesario antes de la translocación de la misma a la cámara proteolítica, además de la apertura de las puertas del complejo 20S debido al desplazamiento de los extremos N-terminal de las subunidades α , que permiten a la proteína entrar en la antecámara (Strickland et al., 2000). Las otras dos subunidades (Rpn1 y Rpn2) actúan como reguladores. La parte superior de la partícula reguladora 19S se denomina tapadera y estaría compuesta por al menos 10 subunidades no-ATPasas. Estas subunidades contienen los sitios de unión para los sustratos ubiquitinados (proporcionando especificidad a la proteólisis), sustratos no ubiquitinados y las enzimas que participan en la hidrólisis y reciclaje de las cadenas de poliubiquitina. Es decir, la tapadera se encargaría de eliminar la cadena de ubiquitina, que sería reutilizada, antes de su entrada en el interior del proteosoma (Figura 19).

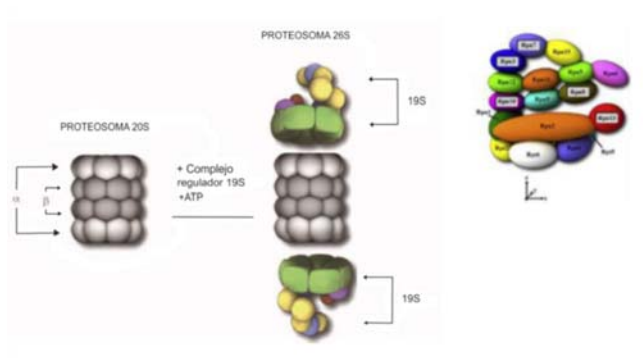


Figura 19. Estructura del proteasoma 26S. (Jung et al., 2009)

En la EA se han descrito alteraciones en la funcionalidad del proteasoma (Tai et al., 2012). En concreto, el trabajo de Keller y col. (2000) describe una disminución de su actividad en áreas afectadas selectivamente por la EA, como el hipocampo o la corteza (Keller et al., 2000c). Las proteínas mal plegadas que escapan a la degradación suelen agregarse debido a que exponen una gran cantidad de residuos hidrofóbicos. De modo que las alteraciones en la actividad del proteasoma podrían relacionarse con la presencia característica de agregados proteicos y proteínas oxidadas en la EA. Estos, además, pueden exacerbar la disfunción del proteasoma (Oddo, 2008). Otra evidencia de la alteración de este sistema en la EA es la acumulación de ubiquitina en las placas y los ONF (Morishima-Kawashima et al., 1993; Jung et al., 2009; Ihara et al., 2012). Los propios ONF y el péptido βA_{1-42} son también capaces de inhibir la actividad del proteasoma, dando lugar a un círculo vicioso que promueve la acumulación de βA y Tau (Zhao and Yang, 2010; Ihara et al., 2012; Tai et al., 2012).

7. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD

Un diagnóstico temprano de la enfermedad sería útil tanto para el seguimiento y estudio de la enfermedad desde sus fases más tempranas, como para el establecimiento de terapias preventivas eficaces. Por tanto, para desarrollar un diagnóstico efectivo, será importante tanto la capacidad de detección de la EA, como de posibles indicadores de conversión desde DCL hasta desarrollar la EA. Las estrategias diagnósticas incluirían tres grandes tipos de pruebas: neuroimagen, análisis de biomarcadores sanguíneos y análisis de biomarcadores en el LCR, además de las pruebas neuropsicológicas.

En la actualidad, el diagnóstico de la EA se basa en los criterios del NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurologic, Communicative Disorders and Stroke - Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) (McKhann et al., 1984). Según este protocolo, el diagnóstico definitivo de la enfermedad solamente se puede realizar con un análisis histopatológico *post-mortem*, y mientras tanto, se diagnostica como probable o posible EA. El diagnóstico clínico se realiza a través de los síntomas, la existencia de alteraciones cognitivas, sociales u ocupacionales y un análisis neuropsicológico. Entre las pruebas destaca el test mini-mental, MMSE (Mini-Mental State Examination) que explora distintas áreas cognitivas (orientación, fijación, concentración, cálculo, memoria y lenguaje) y otorga una puntuación en función de la cual los resultados pueden ser sugerentes de demencia (Roselli et al., 2009). Desde que se publicaran estos criterios, se han descrito numerosas evidencias de que técnicas como la resonancia magnética, de imagen o de espectroscopia, la neuroimagen funcional o la búsqueda de marcadores en fluidos biológicos permiten caracterizar mejor la enfermedad.

7.1. NEUROIMAGEN

Las técnicas de neuroimagen también son muy interesantes desde el punto de vista diagnóstico. Destaca la tomografía por emisión de positrones (PET), que es capaz de medir la actividad metabólica de los tejidos tras detectar la distribución que adopta en ellos un radiofármaco de vida media ultracorta tras ser administrado por vía intravenosa.

La técnica de neuroimagen PET es una tecnología analítica que utiliza compuestos marcados con radioisótopos emisores de positrones (isótopos de oxígeno, ^{14}O ^{15}O ; nitrógeno, ^{13}N ; carbón, ^{11}C , flúor, ^{18}F) para obtener imágenes y valorar procesos bioquímicos *in vivo*, ya que poseen una vida media muy corta (Phelps, 2000).

El trazador de PET más utilizado es la ^{18}F -Fluorodeoxiglucosa (^{18}F -FDG). Este trazador es administrado por vía intravenosa en los sujetos y transportado al interior de las células por el transportador de glucosa, donde es fosforilado por la hexoquinasa a ^{18}F -FDG-6-fosfato, el cual no puede ser metabolizado, quedando así atrapado en la célula, donde su acumulación puede ser medida mediante un scanner de PET (Herschman, 2003). En la Figura 20, se muestra un esquema del proceso de detección de la señal de un tomógrafo. Los positrones emitidos por los radioligandos colisionan con electrones liberando 2 fotones en direcciones opuestas (A). Los fotones liberados que golpean simultáneamente detectores opuestos son registrados como un evento (B) (Herschman, 2003).

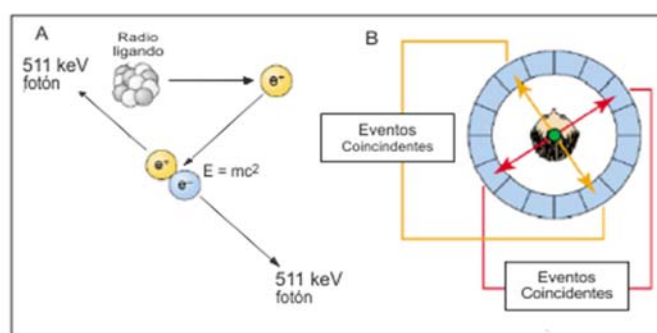


Figura 20. Esquema del proceso de detección de la señal de un tomógrafo (Herschman, 2003).

El mecanismo físico, mediante el cual pueden detectarse estos ligandos, como la ^{18}F -FDG, es el siguiente: los radioisótopos (en este caso ^{18}F) poseen núcleos inestables que al desintegrarse liberan energía en forma de positrones que al colisionar con un electrón sufren un proceso de aniquilación que liberará 2 fotones con la misma energía en direcciones opuestas 180° , solo se detectarán eventos, cuando colisionen simultáneamente en detectores opuestos (Figura 20).

Las imágenes de PET tienen una resolución anatómica muy pobre, por lo que, para poder identificar con exactitud el origen de la señal se suelen superponer a éstas, imágenes por Resonancia Magnética (RMI), en las que se seleccionan las regiones de interés con precisión.

El metabolismo de la glucosa proporciona el 95% de la energía de ATP requerida para una correcta función del cerebro. La ^{18}F -FDG se ha considerado tradicionalmente como un indicador del consumo de glucosa, y por tanto de la actividad cerebral. Desde el comienzo de este tipo de estudios siempre se esperó una reducción en los niveles de ^{18}F -FDG en cerebro de pacientes de EA (Figura 21).

Se han identificado reducciones en el metabolismo de glucosa en corteza de asociación parietotemporal e hipocampo, mientras que se ha visto preservado en otras zonas como los ganglios basales. Las diferencias son significativas entre EA severa y controles, pero no entre EA moderada y EA media (Kumar et al., 1991; Minoshima et al., 1998). También se han descrito diferencias entre el establecimiento del deterioro metabólico de la EA temprana y la EA tardía, la primera comienza a nivel de la corteza cingulada parietal y posterior, y la segunda por el sistema límbico y el lóbulo frontal-medial (Sakamoto et al., 2002). Por otro lado, se ha encontrado que los sujetos con DCL que presentan ApoE4 y una reducción en el metabolismo de glucosa similar a la observada en pacientes con EA, también desarrollaron demencia (Small et al., 2000).

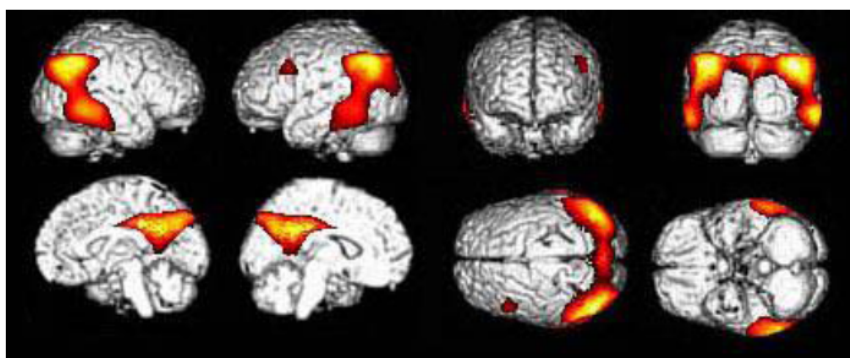


Figura 21. Descenso de la actividad metabólica cerebral típica de la EA. Las zonas que presentan un metabolismo de glucosa reducido a nivel de la corteza cingulada posterior, corteza parieto-temporal y en áreas precuneales. Se indican estas áreas sobre imágenes de Resonancia Magnética (Ishii, 2002)

Es importante realizar un diagnóstico precoz que permita distinguir a la EA de otras demencias. A este respecto el PET proporciona una herramienta muy útil a la hora de detectar la enfermedad hasta 3 años antes que con los sistemas de diagnóstico convencionales con una fiabilidad de hasta el 93% (Phelps, 2000).

Algunos estudios se han llevado a cabo en sujetos asintomáticos con EA familiar y han descubierto déficits metabólicos (detectables mediante PET) correlacionados con la presencia del factor de riesgo ApoE4, 5 años antes de la aparición de los primeros síntomas (Small et al., 2000).

A partir de 1999, comenzaron a desarrollarse scanners para animales pequeños con una resolución de 23 mm^3 , hasta llegar a los 13 mm^3 de resolución espacial actual. Estos nuevos aparatos han permitido obtener imágenes moleculares *in vivo* en roedores similares a las de humanos. Este tipo

de aparatos ya han sido utilizados en el contexto de la EA, para la visualización de placas seniles en modelos transgénicos de la enfermedad gracias a radioligandos específicos (Maeda et al., 2007).

En cuanto al metabolismo de glucosa en los modelos transgénicos, los primeros estudios se realizaron mediante autorradiografía. Valla y col. (2002), utilizando el transgénico PDAPP y el radioligando ^{18}F -FDG observaron una reducción en el marcaje a nivel de la corteza cingulada posterior, significativa respecto a los controles WT (Valla et al., 2002). Otros estudios autorradiográficos utilizando el radioligando 2-DG (^{14}C -2-deoxiglucosa) en los modelos APP-PS1 y PS1 de 15 meses de edad, han mostrado una reducción de la captación de glucosa en algunas regiones cerebrales (corteza cingulada, corteza retrosplenial, tálamo y subáreas de hipocampo), aunque en otras hubo un incremento (Dubois et al., 2010). Por último, Kuntner y col. (2009), utilizando ^{18}F -FDG y el modelo Tg2576 no observaron diferencias significativas en la captación de glucosa en ningún área cerebral a los 13-15 meses (Kuntner et al., 2009).

7.2. BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES

El avance en el conocimiento de la biología de la EA ha favorecido el desarrollo clínico de biomarcadores que permitan un diagnóstico temprano, monitoricen la progresión y puedan servir para la evaluación de terapias. El LCR, caracterizado por su composición constante y su estrecha relación con el sistema nervioso, ha centrado una buena parte de la búsqueda de marcadores diagnósticos. Las determinaciones en el LCR de βA_{1-42} , proteína Tau total y proteína Tau fosforilada han mostrado tener un valor diagnóstico elevado para diferenciar la demencia tipo EA, incluso en fases incipientes de la misma. Los resultados destacan que la disminución en la concentración de βA_{1-42} y el incremento de Tau total o fosforilada en este fluido permiten diferenciar a los pacientes de los controles (Mattsson et al., 2009; Tapiola et al., 2009; Seppala et al., 2012). También se han encontrado marcadores periféricos potenciales en fluidos más fácilmente accesibles como el plasma, en el que además de βA se han encontrado otros marcadores, entre ellos algunos relacionados con estrés oxidativo e inflamación (Kim et al., 2011; Song et al., 2011; Torres et al., 2011).

Dado que las concentraciones plasmáticas de Tau son inferiores a los niveles de detección de la mayor parte de las técnicas analíticas, éstas se han centrado en los péptidos amiloides. La mayor parte del βA en plasma está conjugado con la albúmina y solo una pequeña parte está libre. Existen además una serie de factores que influyen en sus niveles plasmáticos como son el metabolismo, estado de la patología, edad, enfermedad cerebrovascular, catabolismo hepático y excreción renal. Sus niveles son 10 veces menores que en LCR. Algunos estudios han mostrado una correlación entre reducción de niveles de βA_{1-42} pero no βA_{1-40} plasmáticos y el agravamiento de la EA (Mayeux et al., 2003). La medición de los niveles de βA_{1-42} en saliva también puede considerarse un biomarcador periférico potencial (Bermejo-Pareja et al., 2010).

Por estos motivos, algunos autores piden una revisión de los criterios del NINCDS-ADRDA para que, además del diagnóstico clínico, sea necesaria la presencia de al menos, uno de los marcadores mencionados con anterioridad (cambios volumétricos medidos con MRI, alteraciones metabólicas medidas con PET o marcadores en el LCR) (Dubois et al., 2007). En los últimos años, la iniciativa ADNI (Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative) está realizando un estudio longitudinal multicéntrico a nivel mundial para la búsqueda de marcadores para el diagnóstico precoz y seguimiento de la EA (Weiner et al., 2012).

8. MODELOS DE ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD

Durante los últimos veinte años, se han desarrollado un gran número de ratones transgénicos que sobreexpresan APP y/o presenilina, principalmente PS1, basándose en las mutaciones encontradas en los casos de EA familiar. Un resumen de las características de estos ratones se encuentra en la Tabla 3.

Los ratones transgénicos desarrollan progresivamente muchas de las principales características de EA, como elevados niveles de β A, depósitos de amiloide, neuroinflamación, estrés oxidativo, gliosis, pérdida sináptica y déficit cognitivo; sin embargo, ni los ONF ni la muerte neuronal son aparentes en la gran mayoría de los modelos (Balducci and Forloni, 2011).

Tabla 3. Modelos animales de EA

Modelo	Mutación	Promotor	Placas amiloide	Pérdida neuronal	Ovillos	Déficit cognitivo	Referencia
PDAPP	APP 695, 751, 770 (APPInd)	PDGF- β	6-9 meses	No	No	Sí	(Games et al., 1995)
Tg2576	APP695 (APPSwe)	Hamster PrP	9 meses	No	No	Sí	(Hsiao et al., 1996)
APP23	APP751 (APPSwe)	Mouse Thy-1	6 meses	14 meses	No	Sí	(Calhoun et al., 1998)
J20	APP 695, 751, 770 (APPSwe, Ind)	PDGF- β	6 meses	No	No	Sí	(Mucke et al., 2000)
TgCRND8	APP 695 (APPSwe, Ind)	Hamster PrP	3 meses	No	No	Sí	(Chishti et al., 2001)
APP/PS1	Tg2576 X PS1 (M146L)	Hamster PrP PDGF- β	6 meses	No	No	Sí	(Holcomb et al., 1998)
5xFAD	APP 695 (Swe, Lon, Flo) PS1 (M146L, L286V)	Mouse Thy-1	2 meses	9 meses	No	Sí	(Oakley et al., 2006)
rTg4510	4RoN MAPT (Tau-P301L)	Mouse PrP	No	6 meses	4 meses	Sí	(Santacruz et al., 2005)
3xTG	APP 695 (Swe) Tau (P301L) PS1 (M146V)	Mouse Thy-1.2	6 meses	No	12 meses	Sí	(Oddo et al., 2003a)

Para generar las líneas transgénicas se emplean las tres isoformas de APP humana (695, 751 y 770 hAPP), y se introducen mutaciones encontradas en la EA familiar, nombradas según el área geográfica en la que se descubrieron. Destacan la doble mutación Swedish (K670N, M671L) que aumenta la producción de β A; la mutación londinense (V717I) e indiana (V717F) que aumentan preferentemente la forma β A₁₋₄₂; la mutación ártica (E693G) que disminuye el procesamiento por la α -secretasa; y la mutación holandesa (E693Q) que aumenta el ratio β A₁₋₄₀/ β A₁₋₄₂ (Chin, 2011). Los diferentes promotores empleados permiten la expresión preferencial o exclusiva de hAPP (APP humano) en el SNC. Una manera de acelerar la deposición de placas es la cotransfección de APP y PS1 mutados. Las mutaciones en PS1 son de distintos tipos, destacando PS1(A246E), PS1(M146L) y PS1(M146V), y se combinan con las mutaciones en APP para generar diferentes tipos de modelos doble transgénicos.

A pesar de que algunos modelos animales producen Tau hiperfosforilada, no desarrollan ONF, de modo que para investigar su papel, se escogen modelos basados en mutaciones en Tau, entre los que destaca el triple transgénico (3xTg) con mutaciones en APP, PS1 y Tau (Oddo et al., 2003b). Otro de los aspectos claves de la EA, la muerte neuronal, tampoco es evidente en la gran mayoría de modelos murinos, aunque sí se ha observado en algunos, como en el APP23 cuando los ratones alcanzan 14 meses de edad (Calhoun et al., 1998).

Otros modelos combinan dos o tres mutaciones en APP y dos en PS1, como en el caso del 5xFAD que ha mostrado pérdida neuronal a nivel de hipocampo en etapas más tempranas (Casas et al., 2004; Oakley et al., 2006). Aunque ninguno de los modelos reproduce totalmente las características de la enfermedad en humanos, estos modelos permiten estudiar muchos de los aspectos relacionados con la EA, así como valorar posibles tratamientos terapéuticos.

9. TRATAMIENTO ACTUAL DE LA ENFERMEDAD

La búsqueda de un tratamiento eficaz que detenga o ralentice la progresión de la EA sigue siendo uno de los objetivos más importantes de la investigación frente a esta enfermedad. En la actualidad, solamente existen cinco fármacos, aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), para el tratamiento de la EA, aunque están en marcha numerosos ensayos clínicos con fármacos que actúan mediante distintos mecanismos implicados en su patogénesis.

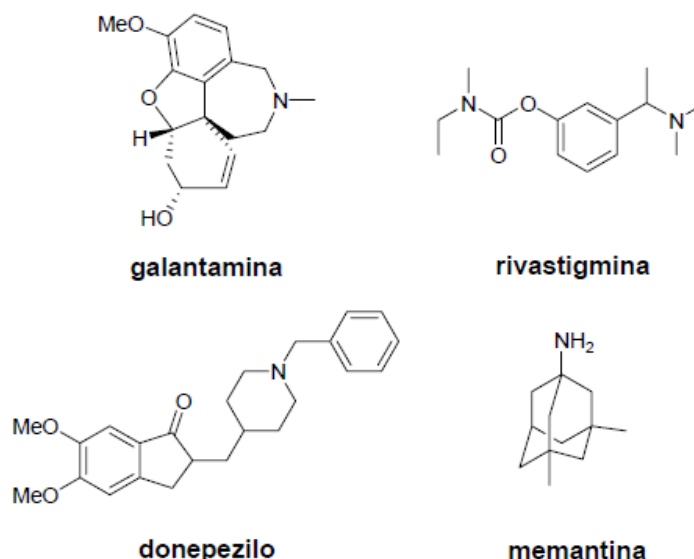


Figura 22. Estructuras de los principios activos de los medicamentos utilizados para el tratamiento de la EA

Una función biológica afectada en la EA es la neurotransmisión colinérgica, responsable de la mayor parte de las alteraciones cognitivas como consecuencia de un déficit de acetilcolina (ACh). Por ende se utilizan fármacos inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChEI) cuyo objetivo es combatir el déficit colinérgico impidiendo la degradación de la acetilcolina en el espacio sináptico. La tacrina fue el primer AChEI aprobado por la FDA en 1993, sin embargo, está en desuso por su hepatotoxicidad. Posteriormente se aprobaron otros tres AChEI, cada uno de ellos con un mecanismo de acción diferente: donepezilo, el más prescrito en la actualidad; rivastigmina y galantamina, cuyas estructuras se muestran en la Figura 22 (Fan and Chiu, 2011). En general, el análisis de numerosas revisiones de la última década señala que estos fármacos tienen un efecto positivo en la función cognitiva, el comportamiento y las actividades de la vida diaria en pacientes con EA leve a moderada, mejorando su calidad de vida y la de sus cuidadores. En alguno de estos pacientes incluso se encontró una mejora en las funciones cognitivas tras 1 o 2 años de terapia (Martorana et al., 2010). Estos fármacos, si bien son los más prescritos, se recetan como tratamiento sintomático, con beneficios únicamente temporales, ya que la enfermedad continúa con su evolución (Chohan and Iqbal, 2006; Klafki et al., 2006; Villarroja et al., 2007).

La única alternativa terapéutica disponible en la actualidad que actúa mediante un mecanismo diferente corresponde a la memantina, un antagonista de los receptores ionotrópicos NMDA de glutamato (Figura 22). La memantina actúa impidiendo la sobreactivación de estos receptores, protegiendo a las neuronas de la excitotoxicidad mediada por calcio, seguido por el restablecimiento de la transmisión fisiológica asociada a un normal funcionamiento celular (Chohan and Iqbal, 2006). Mientras que los AChEI se prescriben para el tratamiento de la EA leve a moderada, la memantina se aprobó el 2003 para el tratamiento de la EA moderada y severa, tanto en monoterapia como en combinación con

donepezilo (Emre et al., 2008). Numerosos estudios han mostrado su eficacia en la mejora de las funciones cognitivas y de comportamiento (Lo and Grossberg, 2011).

El hecho de que en la EA se vean alterados un gran número de procesos y, además, no se conozca una clara relación entre el desarrollo de la enfermedad y las causas que la provocan, hace que existan muchas dianas susceptibles de ser el origen y la solución de la misma. Los compuestos más interesantes que se han descrito en fase clínica II y III, se encuentran recogidos en la Tabla 4.

Tabla 4. Fármacos para la enfermedad de Alzheimer que se encuentran ensayándose en fases clínicas II y III

Fármaco	Fase clínica	Mecanismo de acción	Empresa
Bapineuzumab	Fase III	Anticuerpo monoclonal humanizado del extremo N-terminal del péptido β A.	Pfizer/Jansen
Solanezumab	Fase III	Anticuerpo monoclonal humanizado de la zona central del péptido β A.	Eli Lilly
Inmunoglobulina intravenosa (IVIg)	Fase III	Aislada de sangre humana que tiene propiedades anti- β -amiloide y anti-onflamatorias.	Baxter
Scyllo-Inositol (ELND 005)	Fase II completada Fase III en preparación.	Previene o inhibe la agregación del péptido β A.	Elan
Cloruro de metiltionilo	Fase II completada. Fase III en preparación.	Inhibición de la fosforilación de la proteína Tau o favoreciendo la desagregación del péptido β A.	TauRx Pharmaceuticals
Davenutide (AL-108)	Fase II completada	Estabilizante de microtúbulos. Inhibe la hiperfosforilación de la proteína Tau y la formación de los ONF.	Allon
Tideglusib	Fase IIb	Inhibidor de GSK-3 β , previene la hiperfosforilación de la proteína Tau.	Noscira
PBT2	Fase IIb	Quelante de iones metálicos. Inhibe la hiperfosforilación de la proteína Tau y la agregación del péptido β A.	Prana Biotechnology
CERE-110	Fase II	Adenovirus que actúa a través del gen del factor de crecimiento neuronal (protección neuronal).	Ceregene
BMS-708163	Fase II	Inhibe la formación de γ -secretasa y por tanto la formación del péptido β A.	Bristol-Myers Squibb
PF-04494700 (TTP488)	Fase II	Inhibidor del receptor RAGE, modula la actividad glial y reduce la formación de las placas de β A.	Pfizer.

10. PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS

Dada la complejidad de esta enfermedad neurodegenerativa, el tratamiento mediante la aplicación de fármacos multidiana puede ser una estrategia a considerar, con el objetivo de hacer frente de una manera más eficaz el tratamiento de la enfermedad. Por ello, la obtención de nuevos compuestos capaces de interaccionar favorablemente con varias dianas farmacológicas, también conocidos como ligandos múltiples, supone un reto desde el punto de vista de la investigación y desarrollo de los mismos.

En base a la teoría de la cascada amiloide la reducción de la amiloidosis y la búsqueda de moléculas neuroprotectoras frente al estrés oxidativo constituyen uno de los pilares en la investigación de moléculas potenciales para el tratamiento de esta enfermedad. Diferentes estudios han determinado que el consumo de flavonoides en base a sus propiedades antioxidantes, antiamiloidogénicas, antiinflamatorias, descritas en los últimos años podrían actuar como ligandos múltiples sobre diferentes dianas terapéuticas (Beking and Vieira, 2010; Dajas et al., 2013). En este sentido, interesa investigar

compuestos de naturaleza flavónica con actividad neuroprotectora y con capacidad antiamiloidogénica más específicos, con la finalidad de aportar nuevos compuestos multidiana potencialmente activos en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la EA.

10.1. FLAVONOIDES

El hombre los consume cotidianamente en la dieta ya que están presentes de forma abundante en los vegetales, las frutas rojas como las moras, fresas, zarzamoras (*Vaccinium* spp.); frutas cítricas (*Citrus* spp.), el chocolate (*Theobroma cacao*), las nueces, las bebidas derivadas de la uva (*Vitis vinifera*) como el vino tinto, el té verde y el té negro (*Camelia sinensis*), así como en otros alimentos. También están presentes en plantas medicinales aromáticas pertenecientes a la familia Lamiaceae.

El primer flavonoide fue identificado en 1930 por el premio Nobel de Fisiología y Medicina Albert Szent-Györgyi, quien aisló de la cáscara de limón una sustancia, la citrina, capaz de regular la permeabilidad de los capilares al ser consumida. Los flavonoides se consideraron inicialmente vitaminas, denominados vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C2, porque algunos tenían propiedades similares a la vitamina C.

El interés en estos compuestos decayó en la década de 1940 después de que se demostrara que, al contrario de los micronutrientes, no son esenciales para la salud humana. Sin embargo, mucho más tarde, en la década de 1990, ha tenido lugar una gran expansión en este campo, con la publicación de diversos estudios epidemiológicos que asociaban una menor incidencia del cáncer y las enfermedades cardiovasculares a una mayor ingesta de flavonoides (Hertog and Hollman, 1996). Hoy en día se han publicado más de 50000 estudios sobre flavonoides y más de 10000 sobre quercetina, que representa el principal flavonol en la dieta.

Clasificación

Esta familia se caracteriza por su diversidad estructural. Se han identificado más de 6000 y este número no deja de aumentar (Chong et al., 2010). La absorción, biodisponibilidad y propiedades biológicas de los flavonoides dependen en gran medida de su estructura particular, es decir del tipo de sustituyentes, grupos funcionales, grado de oxidación, formas diméricas, poliméricas, formas glicosidadas o libres, entre otras.

Se caracterizan por tener una estructura básica denominada difenilpropano (C6-C3-C6) formada por 2 anillos aromáticos (A y B) unidos a través de 3 átomos de carbono que normalmente forman un heterociclo oxigenado (anillo C). A su vez, el estado de oxidación del anillo C define seis subfamilias de flavonoides: flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas, flavonoles, y flavanoles, las estructuras químicas de cada subfamilia se presentan en la Figura 23.

En algunos casos, el anillo heterociclo C compuesto por 6 carbonos se presenta de forma isomérica abierta o es remplazada por un anillo de 5 miembros como es el caso de las chalconas. El resto de grupos de flavonoides, que están cuantitativamente menos presentes en la dieta, son los dihidroflavonas, los flavan-3,4-dioles, las cumarinas y las auronas. A continuación se describen las principales características de los tipos de flavonoides que se utilizaron en el presente estudio.

Los flavonoles son los flavonoides más ampliamente distribuidos en las plantas que forman parte de la dieta (Figura 23). Pueden variar en su color desde el blanco hasta el amarillo. Constituyen el grupo de flavonoides más ubicuo en los alimentos, siendo la quercetina el compuesto más representativo. La principal fuente de flavonoles es la cebolla, aunque también son abundantes en la manzana, la col, el puerro, el brócoli y los arándanos y en bebidas como el té y el vino tinto. La biosíntesis de flavonoles es estimulada por la radiación solar, por lo que estos compuestos se acumulan mayoritariamente en las partes más externas de las frutas.

Las uvas (*Vitis vinifera*), y los productos derivados de la uva como el vino, contienen un amplio rango de flavonoles tales como quercetina, miricetina, kaempferol, isorramnetina, quercetina-3-O-glicósido, quercetina-3-O-galactósido, kaempferol-3-O-glicósido y kaempferol-3-O-rutinósido. Las infusiones de té (*Camellia sinenses*) también contienen un variado espectro de flavonoles en forma de mono, di y tri sacáridos.

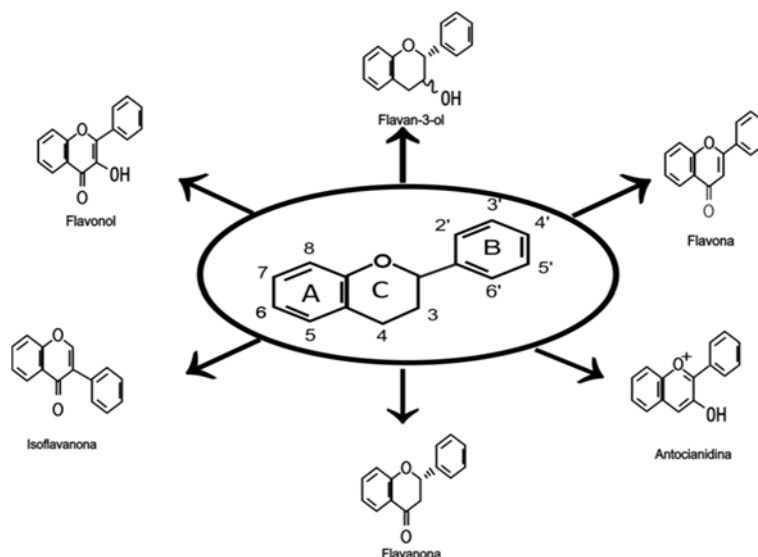


Figura 23. Estructura básica y clasificación de los flavonoides.

Las flavonas tienen una estructura muy similar a los flavonoles y difieren sólo en la ausencia del grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo C (Figura 23). La apigenina y la luteolina son las flavonas más comunes en la dieta. Éstas, a diferencia de los flavonoles, no se encuentran tan ampliamente distribuidas a concentraciones significativas en la dieta. Sólo se han encontrado en altas concentraciones en el apio (*Apium graveolens*), el perejil (*Petroselinum crispum*) y la alcachofa (*Cynara scolymus*).

Las flavanonas están representadas principalmente por la naringenina, la hesperetina y el eriodictiol, aunque también existe un número de compuestos menores, como la sakuranetina y la isosakuranetina. Dos son las características estructurales que poseen las flavanonas, la ausencia de un doble enlace 2, 3 y la presencia de un centro quiral en el carbono-2 (Figura 23).

Efectos farmacológicos

Los flavonoides destacan desde el punto de vista farmacológico por su baja toxicidad y por presentar numerosos efectos biológicos y actividades terapéuticas. Numerosos estudios *in vitro* ponen de manifiesto que estos compuestos tienen efectos antioxidantes, reducen la formación de radicales libres, pueden inhibir la peroxidación lipídica, poseen efectos antimutagénicos y tienen la capacidad de inhibir diversas enzimas (Feroz et al., 2013; Selvaraj et al., 2014; Solmaz et al., 2014). Asimismo, estudios *in vivo* demuestran que los flavonoides potencialmente presentan numerosas actividades farmacológicas, destacando las acciones antineoplásica, protectora vascular, antitrombótica, hipocolesterolemica, hepatoprotectora, antiulcerosa, antimicrobiana, antiviral, antiinflamatoria, analgésica, entre otras. En la Tabla 5 se hace un resumen de algunos de los efectos farmacológicos reportados para diferentes flavonoides.

En general, los flavonoides presentan una marcada actividad sobre el sistema vascular con efecto protector sobre la pared de los vasos, particularmente sobre la pared de los capilares, produciendo una disminución de la permeabilidad y aumento de la resistencia de los mismos. Estudios llevados a cabo en humanos, demuestran que la citrina (mezcla de hesperidina y eriodictiol glucósido) es capaz de normalizar la resistencia vascular alterada por distintas patologías. Igualmente, el O-(β -hidroxietil)-rutósido permite restaurar los parámetros hemorreológicos alterados por la insuficiencia venosa crónica.

A pesar de que los mecanismos exactos de acción responsables de estos efectos continúan sin esclarecerse, se ha postulado que podrían deberse a la acción que ejercen algunos flavonoides sobre las plaquetas, leucocitos y enzimas de la coagulación sanguínea mismos (Di Carlo et al., 1999; Zhou et al., 2006b; Nishida and Satoh, 2009).

Tabla 5. Efectos farmacológicos de algunos flavonoides

Efecto	Flavonoide	Referencia
Antineoplásico	Quercetina, fisetina, baicaleína, epigallocatequina, kaemferol, nobiletina, quercetina, rutina, tangeretina, tricina, woogonina	(Adhami et al., 2012; Spagnuolo et al., 2012; Wang et al., 2013b)
Protectora vascular	Citrina, rutina, quercetina, naringenina, salvigenina, antocianidina	(Zhou et al., 2006b; Nishida and Satoh, 2009)
Antitrombóticas	Tangeretina, hesperidina, rutina	(Singh et al., 2008)
Hipocolesterolémica	Liquiritigenina	(Arai et al., 2000)
Hepatoprotectora	Gosipina, hispidulina, hidroxietilrutósido, kolavirona, quercetina, silimarina, apigenina	(Pradhan and Girish, 2006; Mota et al., 2009)
Antiulcerosos	Kaemferol, quercetina, hipolaetina-8-glucósido, rutina, solona, naringina	(Pradhan and Girish, 2006; Mota et al., 2009)
Antimicrobianos	Quercetina, baicalina, rutina, kaemferol, miricetina	(Singh et al., 2008; Hendra et al., 2011; Nenaah, 2013)
Antiviral	Baicaleína	(Sithisarn et al., 2012; Zandi et al., 2013)
Antiinflamatoria	Hesperidina, luteonina, quercetina, quercitrina, rutina, apigenina, crisina, gosipina, hibrifolina, imiricetina, nepetina, sidertoflavenona	(Spencer et al., 2012)
Analgésica	Hesperidina, quercetina, miricitrina,	(Loscalzo et al., 2008)

Asimismo, ensayos *in vitro*, realizados sobre arterias aisladas de animales de experimentación, demuestran la existencia de flavonoides con acción relajante sobre el músculo liso vascular. Uno de ellos es la salvigenina, cuya actividad vasorrelajante se encuentra estrechamente relacionada con el endotelio, presumiblemente con la liberación de NO y prostaciclina (Uydes-Dogan et al., 2005).

También han sido descritas las propiedades antiagregantes plaquetarias de algunos de estos compuestos, como la tangeretina, hesperidina y rutina, considerándose la inhibición de la ciclooxigenasa (COX) y el consiguiente aumento de los niveles intracelulares de AMPc son los principales mecanismos implicados en dicha actividad (Singh et al., 2008).

Por otra parte, muchos flavonoides poseen propiedades antiinflamatorias como consecuencia de sus interacciones *in vitro* con los linfocitos polinucleares y los trombocitos o con el metabolismo del ácido araquidónico. Desde 1948 se describieron las propiedades antiinflamatorias de la hesperidina, la naringenina y la nobiletina, presentes en la fracción acuosa de casi todas las especies de *Citrus*; a partir de entonces son muchos los estudios *in vivo* e *in vitro* que describen las propiedades antiinflamatorias de los flavonoides y sus mecanismos (Spilkova and Hubik, 1992). Por ejemplo, se ha reportado que miricetina y quercetina a concentraciones relativamente altas, son capaces de bloquear *in vitro* los mecanismos de acción de la COX y la lipoxigenasa, mientras que a concentraciones bajas inhiben sólo la acción de la lipoxigenasa. Estas propiedades antiinflamatorias también se han demostrado *in vivo* (Spencer et al., 2012).

Algunos flavonoides no sólo presentan buena actividad antiinflamatoria sino que además protegen la mucosa gástrica frente a una gran variedad de agentes ulcerogénicos, combinación que resulta de interés terapéutico si recordamos que uno de los principales efectos secundarios de los fármacos antiinflamatorios convencionales es su actividad ulcerogénica (Pradhan and Girish, 2006; Mota et al., 2009). Esta acción gastroprotectora puede ser explicada, en parte, mediante un complejo mecanismo no prostaglandino-dependiente que implicaría aumentos en el contenido de glicoproteína y de la viscosidad del gel mucosal gástrico. Otros mecanismos implicados en esta acción son: captación de radicales libres, actividad antioxidante, estimulación de prostaglandinas, inhibición de la producción de leucotrienos o del factor activador de plaquetas (PAF). Asimismo, se ha reportado la capacidad de quercetina de inhibir el crecimiento de *Helicobacter pylori* y la formación de ácido por las células parietales (Gonzalez-Segovia et al., 2008; Brown et al., 2011; Xiao et al., 2013).

Por otro lado, algunos flavonoides, como quercetina, hesperidina y miricitrina, ejercen actividad analgésica en diversos modelos de experimentación animal, aunque el mecanismo de acción continúa sin esclarecerse (Loscalzo et al., 2008). Asimismo, existen datos que señalan la capacidad de la quercetina para revertir el desarrollo de tolerancia y dependencia a la morfina mediante un mecanismo que podría estar mediado por la inhibición de la actividad NOS (Naidu et al., 2003).

En cuanto a sus efectos sobre el SNC, estudios realizados con animales presentan a los flavonoides como posibles agentes neuroprotectores (Williams and Spencer, 2012; Abdalla et al., 2014; Beckmann et al., 2014; Chang et al., 2014; Qu et al., 2014). Este efecto protector se ha asociado a sus propiedades antioxidantes, captadoras de radicales libres e inhibidoras de la peroxidación lipídica y de la xantina oxidasa (Kling et al., 2014; Kumar et al., 2014). También se ha demostrado que algunos flavonoides (como crisina, apigenina o cirsililol) tienen actividad ansiolítica, observándose que no sólo actúan como ligandos de los receptores benzodiazepínicos sino que también dan resultados favorables en modelos animales (Hui et al., 2002; Coleta et al., 2008; Ognibene et al., 2008; Girish et al., 2013).

La historia del descubrimiento de los efectos de los flavonoides sobre el SNC está ligada al descubrimiento de los receptores del ácido gamma-aminobutírico (GABA), que condujo a la caracterización de dichos receptores y a una incesante búsqueda de las sustancias cerebrales endógenas que se unen a este receptor. Como parte de esta búsqueda se investigó también la presencia de moléculas afines a los receptores de GABA en alimentos de origen animal y vegetal, así como en plantas utilizadas en la etnomedicina en todo el mundo (Wolfman et al., 1996). La gran variedad de interacciones que presentan diversos flavonoides con el receptor del GABA tipo A (GABA_A), condujo a realizar estudios para determinar la interacción selectiva de una variedad de flavonoides naturales y derivados sintéticos. Se ha descrito que la administración oral de la flavona wogonina, aislada de *Scutellaria baicalensis*, una planta utilizada en la medicina tradicional de China, tiene efectos ansiolíticos y previene las convulsiones inducidas por pentilentetrazol y electrochoques en ratones, sin producir efectos sedantes o miorrelajantes. Además, se demostró su interacción con el receptor GABA_A cuando sus efectos fueron bloqueados mediante su coadministración con el antagonista GABAérgico flumacénilo. En la Tabla 6 se recogen los principales efectos de los flavonoides sobre el SNC.

También se ha reportado que el consumo regular de alimentos ricos en flavonoides presenta efectos positivos sobre la función cognitiva (Krikorian et al., 2010a; Krikorian et al., 2010b; Scholey et al., 2010). Diversos estudios describen que el consumo de zumo de uva, granada, fresa y arándano, así como los flavonoides puros como epicatequina y quercetina, ejercen efectos positivos en el aprendizaje (Balk et al., 2006; Hartman et al., 2006; Wang et al., 2006; Pu et al., 2007; Ihl, 2013; Mohanta et al., 2014; Stefani and Rigacci, 2014). Se ha descrito que la administración por vía oral de extractos de fresas, arándanos y moras, todas ellas fuentes ricas en antocianinas y flavonoles, retrasan el déficit cognitivo relacionado con la edad en modelos de roedores. Se ha reportado que los arándanos son eficaces para revertir el déficit de memoria espacial relacionado con la edad (Shukitt-Hale et al., 2009; Rendeiro et al., 2012; Vauzour, 2014; Meeusen, 2014).

Además, los extractos de arándano y mora parecen ejercer efectos más pronunciados a nivel de la memoria a corto plazo, pudiendo estar relacionadas con el efecto neuroprotector de las conexiones sinápticas CA3-CA3 a nivel del hipocampo (Burke and Barnes, 2006; Shukitt-Hale et al., 2009). En este sentido, diversos estudios han evidenciado que los flavonoides derivados de arándanos mejoran la eficiencia de la memoria espacial por acción indirecta a nivel del giro dentado (DG), la subregión del hipocampo más sensible a los efectos del envejecimiento (Burke and Barnes, 2006; Maurer et al., 2006). Incluso, se ha descrito que estos compuestos promueven significativamente la proliferación de las células precursoras en el DG de ratas en edad avanzada (Stangl and Thuret, 2009).

Tabla 6. Efecto de algunos flavonoides sobre el SNC

Efecto	Flavonoide	Referencia
Ansiolíticos	6-metilapigenina, wogonina, luteonina, 6-bromoflavanona, crisina, apigenina o cirsiol	(Hui et al., 2002; Coleta et al., 2008; Ognibene et al., 2008; Girish et al., 2013)
Antiepilépticos o anticonvulsivos	Rutina	(Nassiri-Asl et al., 2008)
Sedantes o inductores del sueño	Hesperidina, spinosina	(Martinez et al., 2009; Wang et al., 2010b)
Antinociceptivos	Miricetrina	(Meotti et al., 2007)
Mejoran la memoria, el aprendizaje y la función cognitiva	Rutina, nobitelina, quercetina, linarina	(Nassiri-Asl et al., 2008; Dajas et al., 2013)
Antidepresivos	Quercetina, apigenina	(Yi et al., 2008; Kawabata et al., 2010)
Moduladores de la función neural	Nobitelina, hesperidina	(Nagase et al., 2005b; Okuyama et al., 2012)
Antiinflamatorios	Wogonina, luteolina, epicatequina,	(Sharma et al., 2007; Vafeiadou et al., 2007; Spencer et al., 2012)
Neuroprotectores	Linarina, quercetina, rutina	(Arredondo et al., 2010; Echeverry et al., 2010; Lou et al., 2011; Richetti et al., 2011; Dajas et al., 2013)

También, existe evidencia sobre el efecto que tienen los flavonoides de revertir el curso del envejecimiento neuronal y conductual en diferentes estudios realizados en animales cuando se administró té (Chan et al., 2006), jugo de granada (Hartman et al., 2006), o flavonoles puros como la quercetina, rutina (Pu et al., 2007), o fisetina (Maher et al., 2006). Posiblemente los efectos que ejercen estos compuestos no solamente se relacionan con la memoria y/o aprendizaje, sino también pueden ejercer cambios positivos en la actividad psicomotora de los animales en edad avanzada (Shukitt-Hale et al., 2009).

Por tanto, los efectos antioxidantes de algunos flavonoides pueden ser importantes para ayudar a recuperar la homeostasis óxido-reducción en las patologías degenerativas y los trastornos asociados al envejecimiento, como la EA, la demencia senil y las fallas en los procesos cognitivos como la memoria y el aprendizaje, que se caracterizan por presentar un alto estrés oxidativo celular (Beking and Vieira, 2010).

Diferentes estudios han determinado que el consumo de flavonoides, especialmente flavonoles, en base a sus propiedades antioxidantes, antiamiloidogénicas, neuroprotectoras, antiinflamatorias, descritas en los últimos años, podrían ser potencialmente activos en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la EA (Beking and Vieira, 2010; Dajas et al., 2013). Se ha descrito que el consumo de alimentos ricos en flavonoides retrasan la aparición y/o progresión de la EA (Dai et al., 2006; Barberger-Gateau et al., 2007). Por ejemplo, se ha observado que la administración a largo plazo de catequina del té verde mejoró el aprendizaje espacial y la memoria en ratones propensos a senescencia (Li et al., 2009). La administración oral de EGCG del té verde durante 6 meses en ratones que

sobreexpresan la mutación sueca de APP (Tg2576) redujo significativamente los niveles del β A, lo que se tradujo en una mejora de la función cognitiva (Rezai-Zadeh et al., 2008). Joseph y col. (2003) reportaron que los ratones transgénicos APP/PS1 alimentados con arándanos desde los 4 meses de edad mostraron un buen desempeño en el laberinto Y a los 12 meses de edad comparados con los ratones transgénicos sin tratamiento (Joseph et al., 2003).

Sin embargo, los mecanismos implicados en estos cambios no están claros, probablemente estarían relacionados con el aumento de la actividad de la enzima antiamiloidogénica α -secretasa (Obregon et al., 2006), la reducción de los niveles del β A o mediante la inhibición de la agregación y/o desagregación de las fibras preformadas, o como resultado de la actividad quelante de metales (Ono et al., 2003; Hirohata et al., 2007; Mandel et al., 2007; Amit et al., 2008; Mandel et al., 2008; Ono et al., 2008; Onozuka et al., 2008; Wang et al., 2008; Vepsäläinen et al., 2012; Park et al., 2014; Xie et al., 2014).

Otro mecanismo interesante sería el efecto, que provocan algunos flavonoles y flavonas, de disminuir la expresión génica de BACE o la inhibición de su actividad enzimática (Shimmyo et al., 2008a, b). Estos resultados guardan coherencia con otros estudios que reportan la reducción del β A frente al tratamiento con extractos ricos en flavonoides tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* (Akaishi et al., 2008; Shimmyo et al., 2008a; Choi et al., 2010; Dajas et al., 2013).

Es innegable la relación que existe entre el β A y la EA, no obstante la patología del β A y el déficit cognitivo no se correlacionan del todo. Probablemente los efectos beneficiosos de los flavonoides sobre la función cognitiva no solamente se circunscriban a cambios a nivel de la cascada antiamiloidogénica, sino que podrían ejercer efectos en otros eventos clave relacionados con la enfermedad, por ejemplo, la fosforilación de Tau y su agregación. En este sentido, se ha descrito que ciertos flavonoides como nobilina, miricetina y galato de epicatequina (EG), presentan un potente efecto inhibitorio de la agregación de Tau (Taniguchi et al., 2005; Jones et al., 2011; Nakajima et al., 2013).

Del mismo modo se ha descrito que la administración oral de dosis agudas de extractos de procianidinas de pepita de uva y el EGCG tienen la propiedad de inhibir la agregación de Tau, desagregar las fibrillas preformadas e interrumpir la generación de PHU (Ho et al., 2009; Wang et al., 2010a; Ksiezak-Reding et al., 2011). Además, los flavonoides son capaces de inhibir el proceso neuropatológico de Tau a través de un mecanismo alternativo. Por ejemplo se ha descrito que la (-)-epicatequina y la hesperetina promueven la fosforilación de Akt, inhibiendo de este modo la hiperfosforilación de Tau inducida por GSK-3 β (Schroeter et al., 2007; Vauzour et al., 2007).

Por otro lado, Matsuzaki y col. (2006) reportaron que la nobilina posee un mecanismo único de acción neurotrófica ya que revirtió la pérdida de memoria inducida por el péptido β A y mejoró la memoria olfativa de ratas bulbectomizadas, favoreciendo de esta forma el desarrollo, crecimiento y funcionamiento neuronal (Matsuzaki et al., 2006). Los autores señalan que la nobilina interactúa selectivamente con dos proteínas cinasas: MAPK y CREB cuya activación favorece el crecimiento de nuevas conexiones sinápticas proporcionando un estado estable de la memoria a largo plazo (Nagase et al., 2005a). En 2007, este mismo equipo de investigadores mostró que la nobilina interactúa con el sistema glutamatérgico, en particular con los receptores AMPA, para ejercer sus efectos sobre la memoria (Nakajima et al., 2007; Matsuzaki et al., 2008).

Por otro lado, se han descrito una serie de factores de riesgo asociados tanto con la EA y la demencia vascular, incluyendo la edad, la hipertensión, la arteriosclerosis, la *diabetes mellitus*, tabaquismo, fibrilación arterial, y el genotipo ApoE4 (Nishimura et al., 2014). Los datos epidemiológicos sugieren que los flavonoides podrían modular los factores de riesgo cardiovascular incluyendo los asociados con el accidente cerebrovascular y la demencia (Vauzour, 2014). Hay pruebas sólidas que sugieren que los flavonoides son capaces de promover mejoras clínicamente significativas en la salud cardiovascular a través de su potencial de reducir la presión arterial (McCullough et al., 2012; Prahalathan

et al., 2012; Macready et al., 2014), mejorar la función endotelial (Zhou et al., 2006b; Nishida and Satoh, 2009), inhibir la agregación plaquetaria (Singh et al., 2008), y reducir la respuesta inflamatoria (Spencer et al., 2012). Tales cambios facilitarían el flujo sanguíneo cerebral de manera más eficiente, siendo vital para la función óptima del cerebro, de manera más acusada en pacientes con demencia (Spencer, 2009a; Williams and Spencer, 2012).

Además, se ha reportado que el incremento significativo de la función vascular cerebral promovería la neurogénesis a nivel del hipocampo incluso en adultos (Stangl and Thuret, 2009). De hecho, los estudios han demostrado que las nuevas células del hipocampo se agrupan cerca de los vasos sanguíneos y áreas de angiogénesis y proliferan en respuesta a factores de crecimiento vascular (Palmer et al., 2000). La angiogénesis se caracteriza por estar acompañada de la producción de NO derivado del endotelio, clave de la remodelación vascular y la angiogénesis (Moraes et al., 2014). Los efectos vasculares de flavanoles y otros flavonoides están en parte mediados por su capacidad para inducir la producción de NO en el endotelio, a través de un mecanismo que implica la activación de eNOS (Jamaluddin et al., 2013). Los flavonoides pueden activar la eNOS por su capacidad para inducir la fosforilación Akt. En este sentido, puede postularse que la activación inducida por los flavonoides sobre Akt y eNOS en células endoteliales puede aumentar la biodisponibilidad del NO en la vasculatura del hipocampo por ende activar la angiogénesis y la neurogénesis. Incluso, el aumento de la vascularización en el hipocampo probablemente establezca la presencia de las nuevas neuronas (Zhao et al., 2008).

Metabolismo

Aunque numerosos estudios han descrito los efectos de diversos flavonoides en el SNC, es escasa la información de cómo atraviesan la BHE. Estudios recientes *in vitro* e *in vivo* indican que tanto las agliconas como sus productos de conjugación son capaces de atravesar la BHE (de Boer and Gaillard, 2007). Algunas investigaciones indican que flavonoides glicosidados como el 3- β -rutinosido de cianidina y el glucósido de pelargonina, así como hesperetina, naringenina y sus productos de conjugación atraviesan la BHE (Wieland et al., 1992; Bruton and Qume, 1999). La capacidad de los flavonoides de atravesar la BHE no sólo depende de su lipofilia sino también de su capacidad de conjugación. Los metabolitos que son conjugados por metilación en el intestino delgado y en el hígado, al ser más lipofílicos, pueden atravesar la BHE con mayor facilidad que sus agliconas de origen. Por la misma razón se pensaría que los metabolitos más polares, por ejemplo los resultantes de conjugación por glucuronidación o los glicosilados, no podrían atravesar la BHE. Existen investigaciones que sugieren que *in vivo* esta clase de glicósidos la atraviesan cuando se unen a transportadores específicos dependientes de ATP como la glicoproteína P (Gly-P) expresada en la BHE. Estudios recientes muestran que algunos flavonoides no sólo son transportados por la Gly-P sino que interactúan con ésta moderando su actividad, por lo que los flavonoides han sido descritos como “modificadores de la respuesta biológica” por su capacidad de modular la reacción del organismo ante xenobióticos (Hadjeri et al., 2003; Cao et al., 2007).

Por último, hay que señalar que la inhibición que ejercen los flavonoides sobre numerosas enzimas (responsable de algunas de sus propiedades terapéuticas) también puede dar lugar a distintas interacciones farmacológicas. Así, los flavonoides modulan la actividad de los citocromos P450 (CYP). Por ello, no es de extrañar que con frecuencia se produzcan interacciones por la administración simultánea de flavonoides con fármacos que sufran este metabolismo, produciéndose un aumento de la toxicidad del propio fármaco o bien una disminución de su efecto terapéutico. Entre los flavonoides capaces de estimular al CYP3A4 aparece la tangeretina, mientras que silimarina o la biapigenina actúan como inhibidores (Raucy, 2003; Choi et al., 2011).



MATERIALES Y MÉTODOS

1. ENSAYOS *IN VITRO*

1.1. PREPARACIÓN DE LOS FLAVONOIDES

Los 6 flavonoides estudiados en el presente trabajo fueron quercetina, rutina, troxerutina, diosmina, hidrosmina y naringina, los cuales fueron adquiridos de la casa comercial Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, USA). Los flavonoides se prepararon a una concentración de 50 mM en DMSO, y posteriormente se filtraron (0,2 μ m). Las soluciones se almacenaron protegidas de la luz a -20°C hasta su uso.

1.2. INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD β -SECRETASA

Para medir la posible inhibición de la actividad β -secretasa por parte de nuestros compuestos, se utilizó la enzima BACE recombinante y el sustrato fluorogénico (H₂N-Arg-Glu(EDANS)-Glu-Val-Asn-Leu-Asp-Ala-Glu-Phe-Lys(DABCYL)Arg-OH (Calbiochem)). Dicho sustrato se hidroliza a nivel de las uniones Leu-Asp liberando como producto un compuesto fluorescente; este último nos permite cuantificar la actividad enzimática de BACE, ya que la fluorescencia emitida será directamente proporcional a la actividad enzimática.

Las condiciones de reacción que se utilizaron fueron: 0,24 U de enzima BACE recombinante humana, en el tampón de reacción compuesto por acetato sódico 50 mM pH=4,5, sustrato fluorogénico a la concentración de 10 μ M en un volumen final de 100 μ l. El tiempo de incubación fue de 1 hora a 37°C. Los compuestos se evaluaron a una concentración final de 100 μ M.

La fluorescencia se midió en un Fluorímetro FLx800 (Microplate fluorescent reader BIOT-TEK. Programa KC junior) a λ_{exc} = 360 nm; λ_{em} = 528 nm. Los componentes de reacción se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7. Componentes de reacción para medir la actividad enzimática de BACE.

	BACE	Compuestos	Sustrato
Actividad control	0,24 U	-	✓
Blanco control	-	-	✓
Actividad con compuesto	0,24 U	✓	✓
Blanco compuesto	-	✓	✓

La reacción control representa la actividad enzimática de 0,24 U de BACE menos la fluorescencia emitida por el blanco. Para cada uno de los compuestos se cuantificó la fluorescencia intrínseca en presencia de todos los componentes de reacción a excepción de enzima, este valor se utilizó como blanco.

1.3. INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD γ -SECRETASA

El complejo pentamérico que constituye la γ -secretasa no se encuentra disponible comercialmente. Para evaluar la actividad de dicho complejo se utilizó un extracto celular enriquecido en membranas.

Para la obtención de las membranas, se utilizó la línea celular transgénica APPswe. El pellet celular de 2 placas se resuspendió en 300 μ L del tampón de lisis (Tris-HCl 5 mM pH=8, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, PMSF 2 mM, leupeptina 25 μ g/ml, peptatina 10 μ g/ml, quimostatina 10 μ g/ μ l y aprotinina 2 μ g/ μ l), se homogenizó y se incubó 15 min en hielo. Se centrifugó a 800 g durante 10 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante, el cual se volvió a centrifugar a 20000 g durante 1 hora a la misma temperatura. El pellet celular conteniendo las membranas se resuspendió en el mismo tampón de lisis, adicionando CHAPS 0,25% para favorecer la disolución del pellet. La cantidad de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Para medir la actividad enzimática de γ -secretasa se utilizó 15 μ g de proteína por muestra y un sustrato fluorogénico específico (NMA-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-Thr-Val-Lys(DNP)-D-Arg-D-Arg-D-Arg-NH₂ (Calbiochem)), en presencia de los compuestos a 100 μ M (concentración final). El tampón de reacción empleado contenía KCl 150 mM, Tris-HCl pH=6.8, EDTA 2 mM, CHAPS 0,25%, para un volumen final de reacción de 100 μ l. Se midió la fluorescencia en un Fluorímetro FLx800 a λ_{exc} = 360 nm; λ_{em} = 460 nm. Los componentes de reacción para cada caso se detallan en la Tabla 8.

Tabla 8. Componentes de reacción para medir la actividad enzimática de γ - secretasa.

	15 μ g E.M.*	Compuesto 100 μ M	Sustrato 50 μ M
Actividad control	✓	-	✓
Blanco control	-	-	✓
Actividad con compuesto	✓	✓	✓
Blanco compuesto	-	✓	✓

*E.M. Extracto de membranas.

La reacción control representa la actividad enzimática de 15 μ g de extracto de membranas menos la fluorescencia emitida por la reacción del blanco. Para cada uno de los compuestos se cuantificó la fluorescencia intrínseca en presencia de todos los componentes de reacción a excepción de enzima, este valor se utilizó como blanco. Como control positivo se utilizó el inhibidor específico de γ -secretasa L-685,458 a una concentración final de 1 μ M.

1.4. INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ACETILCOLINESTERASA (AChE)

La actividad de la AChE se determinó espectrofotométricamente según el método Ellman y col 1961 modificado (Ellman et al., 1961). El sustrato utilizado fue yoduro de acetiltiocolina (ATCI), el cual, al ser hidrolizado por la enzima AChE libera tiocolina, la cual reacciona con el cromóforo ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) para dar lugar a un compuesto coloreado cuyo pico de máxima absorbancia es a λ = 412 nm.

Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos en un volumen final de reacción de 200 μ L. Los flavonoides se evaluaron a la concentración de 100 μ M en el tampón de reacción (Tris-HCl 50 mM pH=8, BSA 1 mg/ml), 0,025 U de AChE y DTNB 1,5 mM. La mezcla de reacción se incubó durante 5 min a temperatura ambiente, y finalmente se agregó el sustrato de la reacción a una concentración final de 1,5 mM. Se realizó la lectura a 412 nm en un lector de placas DigiScan (Software DigiWin) durante 3 min con lecturas cada 10 s. Como control positivo se utilizó la galantamina a una concentración final de 10 μ M. Los componentes de la reacción en cada caso se especifican en la Tabla 9.

Tabla 9. Componentes de reacción para medir la actividad enzimática de AChE.

	AChE	Compuesto	Sustrato
Actividad control	0,025 U	-	✓
Actividad con compuesto	0,025 U	✓	✓

1.5. ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE LA AGREGACIÓN Y DESAGREGACIÓN DEL PÉPTIDO β A

Preparación del péptido β A

Para estudiar la agregación del péptido β A, hemos utilizado el fragmento 25-35 de dicho péptido. Este fragmento representa la región biológicamente activa del β A ya que retiene las propiedades de agregación y de toxicidad del péptido completo β A₁₋₄₂ (Casley et al., 2002). 1 mg del liofilizado del β A₂₅₋₃₅ (Genscript) se disolvió en DMSO, a una concentración de 1 mM, se agitó en vórtex a máxima potencia para romper los agregados previamente formados. Alícuotas de este preparado se almacenaron a -80°C hasta su uso.

El péptido βA_{25-35} se disuelve a una concentración final de $10 \mu M$, en 1 ml de PBS pH=7,4. Se incubó a $37^{\circ}C$ en agitación constante durante 4 días, con la finalidad de formar agregados amiloides característicos.

Para estudiar la posible inhibición de la agregación del βA_{25-35} por parte de los flavonoides en estudio, éstos se adicionaron a diferentes concentraciones al comienzo de la incubación del βA_{25-35} , en las condiciones anteriores ($37^{\circ}C$, 4 días).

Para estudiar el posible efecto desagregante del βA_{25-35} , los flavonoides se añadieron a distintas concentraciones al finalizar el proceso de agregación (4° día), manteniéndose 3 días adicionales a $37^{\circ}C$ y en agitación continua.

Finalizado el tiempo de incubación, se utilizaron diferentes técnicas: cualitativas (ME) y cuantitativas (espectroscopia de fluorescencia estacionaria o resuelta en el tiempo), para determinar el efecto inhibitorio y/o desagregante de los compuestos. Pasaremos a describir cada una de ellas.

Estudio de la agregación del péptido βA_{25-35} por microscopía electrónica

Finalizados los tiempos de incubación de la inhibición de la agregación, se tomaron 3 μl de la muestras y se aplicaron sobre una rejilla de "Formvar/carbon" durante 30 s. Al cabo de este tiempo la rejilla se secó con papel filtro y se colocó en contacto con acetato de uranilo al 2% durante 20 s. Una vez seca la rejilla se observaron al ME modelo JEOL JEM-4000 EX.

Cuantificación de la agregación del βA_{25-35} por espectroscopia de fluorescencia en fase estacionaria

El método se fundamenta en la capacidad de la tioflavina T (ThioT), colorante tiazolidínico, de intercalarse entre los agregados de βA , produciendo un compuesto cuya fluorescencia es proporcional a la cantidad de agregado.

Al finalizar los tiempos de incubación de los experimentos de inhibición y desagregación, se añadió ThioT a una concentración final de $25 \mu M$, se agitó fuertemente durante 10 s, para favorecer la formación del complejo fluorescente βA -ThioT, para su respectiva cuantificación. Se midió la fluorescencia en el FluoroMax-4P Compact Spectrofluorometer (HORIBA Jobin Yvon), $\lambda_{exc} = 450 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 482 \text{ nm}$. La fluorescencia correspondiente a cada muestra se obtuvo al restar la fluorescencia de blanco que contenía solo ThioT $25 \mu M$ en PBS pH = 7,4.

Los resultados se expresaron como porcentaje respecto de la reacción control.

Cuantificación de la agregación del βA_{25-35} por espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo

Esta técnica permite determinar el tiempo de vida media (τ , ns) de los fluoróforos. Una de las características más importantes de un fluoróforo es el tiempo promedio que permanece en el estado excitado antes de su retorno al estado fundamental. Por tanto, expresa el tiempo disponible para que el fluoróforo interactúe con el ambiente (difunda, rote, se quenchee) brindando de este modo información de su emisión.

En este caso se cuantificó el tiempo de vida media del complejo βA -ThT, transcurridos los tiempos de incubación de los experimentos de inhibición y desagregación. Se añadió ThioT a una concentración final de $25 \mu M$, se agitó durante 10 s, previa a la cuantificación. El decaimiento de la intensidad de la fluorescencia fue medida en el FluoroMax-4®, basado en la técnica de conteo de fotones únicos correlacionados temporalmente (Time-Correlated Single-Photon Counting, TCSPC), que incluye un diodo laser (Horiba-Jobin-Yvon). Este método determina la intensidad de emisión de la fluorescencia en función del tiempo. El tiempo de vida media representa el promedio de tiempo durante el cual el

complejo β A-ThioT permanece excitado en el primer estado electrónico antes de retornar al estado fundamental.

La determinación del tiempo de vida media del β A-ThioT en presencia de quercetina y rutina se realizó con la finalidad de confirmar el efecto inhibitorio de la formación de los agregados del péptido β A y/o el efecto desagregante de los compuestos. Las muestras se excitaron a 463 nm y la intensidad de la fluorescencia se registró a 482 nm. Como consecuencia de la excitación del complejo β A-ThioT por el pulso laser, se obtiene un histograma de la fluorescencia en función del tiempo.

2. CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR DE NEUROBLASTOMA HUMANO APP^{swe}

Se utilizó como modelo de Alzheimer experimental la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y transfectada por el gen APP695 (APP^{swe}, KM670/671NL). Esta línea transgénica contiene una doble mutación en el codón 670 y en el codón 671, que origina un cambio en la secuencia de aminoácidos lo que provoca un incremento en la eficacia proteolítica de BACE, y como consecuencia, un incremento en la producción del β A. Dicha mutación se asocia con la aparición temprana de EA familiar, y puede promover estrés oxidativo en las células debido a la sobreproducción del péptido β A.

La línea celular SH-SY5Y-APP^{swe} (APP^{swe}) fue donada por el Prof. Weihong Song, de la Universidad British Columbia, Vancouver, BC, Canadá. En la Figura 24, se muestra una fotografía de las células APP^{swe} a 10X de aumento, observada en el microscopio invertido Nikon (modelo TMS).

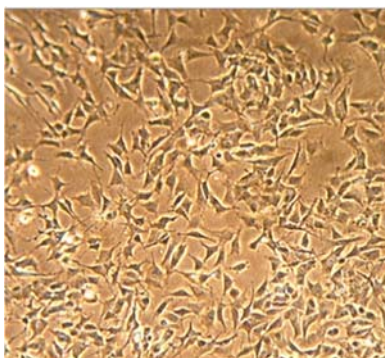


Figura 24. Línea celular transgénica de neuroblastoma humano SH-SY5Y-APP^{swe} (APP^{swe}).

2.1. VIABILIDAD CELULAR. REDUCCIÓN DEL BROMURO DE 3-(4,5 DIMETILTIAZOL-2-IL)2,5 DIFENILTETRAZOLIO (MTT)

Este método se fundamenta en la capacidad de las células viables de reducir sales de tetrazolio como el MTT por las deshidrogenasas mitocondriales que lo transforman en formazán, un producto insoluble en agua que forma unos cristales de color azul oscuro. Esta técnica constituye una medida cuantitativa de la viabilidad celular ya que la cantidad de formazán formado es proporcional al número de células viables presentes en el cultivo celular.

Para evaluar el efecto de los compuestos sobre la viabilidad celular se sembraron 40000 células/pocillo de APP^{swe} en placas de 96 pocillos. Transcurridas 24 h, las células se trataron con los flavonoides en estudio a diferentes concentraciones, en el medio de cultivo DMEN suplementado con 1% de suero bovino fetal (FBS), incubándose durante 24 h a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se eliminó el sobrenadante y se añadió la solución de MTT (2 mg/ml, en PBS), en el medio de cultivo, incubándose a 37°C, durante una hora. Seguidamente se eliminó el medio y se agregaron 100 μ l de DMSO para disolver los cristales de formazán. Se mezcló bien y se realizó la lectura a $\lambda = 550$ nm en un lector de placas DigiScan.

2.2. ACTIVIDAD LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)

La LDH es una enzima citosólica que se libera al medio cuando hay muerte celular. Esta enzima cataliza la reacción de oxidorreducción reversible de piruvato a lactato, en presencia del cofactor enzimático NADH, que presenta un máximo de absorbancia a $\lambda = 340 \text{ nm}$ (Sun et al., 1997).

Para determinar la LDH liberada al medio de cultivo, las células APPswe se sembraron a una densidad de 100000 cel/pocillo en placas de 24 pocillos, en el medio de cultivo DMEN manteniéndose a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%, durante 24 h. Las células se trataron con diferentes concentraciones de los flavonoides en estudio durante 24 h. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se trasvasaron 100 μL del sobrenadante de cada pocillo y se adicionó 100 μL de la mezcla de reacción (Piruvato sódico 0,18 mM y NADH 0,60 mM, en tampón fosfato 50 mM, pH 7,4). Medimos el descenso de la fluorescencia durante 1 minuto a $\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ en el Fluorímetro FLx800.

2.3. ESQUEMA GENERAL DE TRATAMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR APPswe

Para la realización de los tratamientos se sembraron aproximadamente $2 \cdot 10^6$ células en placas petri de 100 mm de diámetro, en el medio de cultivo DMEM suplementado con aminoácidos no esenciales, 15% de FBS, 2 mM de glutamina y 300 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina B. Las células se mantuvieron a 37°C en un incubador con 5% de CO₂, hasta alcanzar el 80% de confluencia (aproximadamente 96 h). Las células en fase logarítmica se trataron con los flavonoides, en medio de cultivo DMEN suplementado con 1% de FBS durante 24 h a 37°C y en una atmósfera al 5% de CO₂.

Después de los tratamientos, se obtuvieron los pellet celulares y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

2.4. INHIBICIÓN DE LA GENERACIÓN DE RADICALES LIBRES INDUCIDA POR H₂O₂

Para la determinación de la generación intracelular de radicales libres, utilizamos el método de oxidación del diacetato de diclorofluoresceína (DCFA-DA) (LeBel et al., 1992) compuesto no fluorescente que penetra en las células, atravesando la membrana celular. La DCFA (no fluorescente) se libera por acción de las esterasas plasmáticas, en el interior de la célula, y en contacto con los radicales libres se transforma en un compuesto fluorescente, propiedad que aprovechamos para su cuantificación. Como inductor de la liberación de radicales libres se utilizó el agente citotóxico H₂O₂ a una concentración de 100 μM .

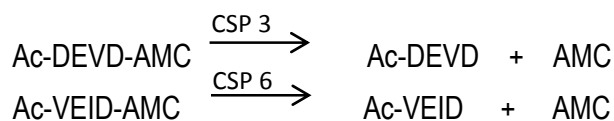
Para este ensayo se sembraron 40000 células/pocillo de neuroblastoma humano APPswe en placas de 96 pocillos. Transcurridas 24 h, las células se trataron con el DCFA-DA a 10 μM , en medio DMEM sin rojo fenol a 37°C y 5% de CO₂ durante 30 min, con la finalidad de que el DCFA-DA se incorpore dentro de la célula. A continuación se lavan con PBS y posteriormente se agregan los flavonoides a diferentes concentraciones, 30 min antes de adicionar el H₂O₂, permitiendo que el flavonoide se incorpore a la célula. La fluorescencia se midió en el Fluorímetro FLx800 a $\lambda_{\text{exc}} = 485 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$, 60 min después de la adición del H₂O₂.

2.5. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CASPASAS 3 Y 6

Las caspasas son un grupo de proteínas perteneciente al grupo de las cisteín-proteasas, caracterizadas por presentar un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas. En el caso de las caspasas el corte se produce al nivel de un residuo de aspartato de lo que deriva su nombre (cisteinil-aspartato proteasas).

El ensayo fluorimétrico se basa en la hidrólisis de un sustrato peptídico acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-metilcumarina (Ac-DEVD-AMC) por la caspasa 3, y del N-Acetil-Val-Glu-Ile-Asp 7-amido-4-metilcumarina (Ac-VEID-AMC) por la caspasa 6. Ambas enzimas liberan la fracción fluorescente 7-amino-4-metilcumarina (AMC), cuya fluorescencia se determinó a las longitudes de onda de excitación y emisión

de 360 y 460 nm, respectivamente. Las reacciones que realizan cada una de las enzimas se muestran a continuación.



Soluciones de trabajo:

- Tampón de lisis: HEPES 50 mM pH 7,4, NaCl 100 mM, CHAPS 0,1%, glicerol 10%, DTT 10 mM, EDTA 2 mM, PMSF 1 mM, y las antiproteasas leupeptina, pepstatina y aprotinina a la concentración final de 1 µg/ml.

- Tampón de reacción: HEPES 50 mM pH 7,4, NaCl 100 mM, CHAPS 0,1%, glicerol 10%, DTT 10 mM, EDTA 2 mM.

Procedimiento:

El pellet celular conteniendo aproximadamente $4,5 \cdot 10^6$ células, se resuspendió en 100 µl de tampón de lisis, se sonicó durante 10 s, se llevó a un baño de hielo durante 15 min. Para separar los restos celulares se centrifugó a 14000 g durante 15 min a 4°C, recogiendo el sobrenadante donde se determinó la actividad. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

20 µg del extracto proteico se incubó en el tampón de reacción con 20 µM de los sustratos fluorogénicos correspondientes para las caspasas 3 y 6, durante 60 min a 37°C. La hidrólisis del sustrato se cuantificó por medición de la fluorescencia emitida en el Fluorímetro FLx800. Los resultados se presentaron como unidades arbitrarias de fluorescencia (URF).

2.6. ACTIVIDAD DEL PROTEASOMA 20S Y 26S

Para la actividad del proteasoma se utilizó un sustrato fluorogénico específico que lleva unido al extremo terminal una molécula de AMC que al liberarse emite fluorescencia. Se midió la actividad específica de la subunidad β5 que hidroliza preferentemente enlaces peptídicos en el extremo carboxilo de aminoácidos hidrofóbicos (actividad CT-L o *chymotrypsin like activity*), empleándose el péptido fluorogénico Suc-leu-leu-Val-Tyr-MCA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Soluciones de trabajo:

- Tampón de lisis: Sucrosa 0,25 M, HEPES 100 mM pH 8, MgCl₂ 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM.

- Tampón de reacción 20S: Tris-HCl 225 mM pH 8, MgOAc 7,5 mM, MgCl₂ 7,5 mM, KCl 45 mM, DTT 1 mM.

- Tampón de reacción 26S: Tris-HCl 225 mM pH 8, MgOAc 7,5 mM, MgCl₂ 7,5 mM, KCl 45 mM, DTT 1 mM, ATP 100 µM.

Procedimiento:

El pellet celular conteniendo aproximadamente $4,5 \cdot 10^6$ de células se resuspendió en 100 µl de tampón de lisis. Para favorecer la lisis celular, las muestras se sometieron a 3 ciclos de congelación y descongelación. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 14000 g durante 20 min a 4°C, recogiendo el sobrenadante en el que se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Para evaluar la actividad del proteasoma se tomaron 10 µg del extracto proteico, 50 µM del fluoropéptido Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, 75 µL del tampón de reacción sin ATP (para la actividad 20S) o con 100 µM de ATP (para la actividad 26S). La actividad se determinó tras la incubación de la mezcla

de reacción durante 60 min a 37°C. La fluorescencia se midió a $\lambda_{exc} = 360 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$ en el Fluorímetro FLx800. Los resultados se representaron como URF. El resumen de los componentes de reacción se presenta en la Tabla 10.

Tabla 10. Componentes de reacción		
Componentes	20S	26S
10 μg de extracto proteico	✓	✓
Tampón de reacción	✓	✓
ATP	-	✓
Sustrato	✓	✓

3. MODELO ANIMAL DE ALZHEIMER EXPERIMENTAL

Como modelo *in vivo* de Alzheimer experimental hemos seleccionado la línea transgénica de ratón Tg2576 (B6;SJL-Tg(APP^{SWE})2576Kha), línea “knock-in” heterocigota, que lleva inserta la hAPP con la doble mutación sueca de la enfermedad de Alzheimer (K670N, M671L) y como controles negativos, ratones wild type (WT) de la misma colonia (Hsiao et al., 1996).

La colonia de ratones Tg2576 (B6;SJL-Tg(APP^{SWE})2576Kha), se desarrolló en nuestro laboratorio a partir de machos heterocigotos y hembras WT. Los progenitores transgénico fueron donados por la Dra Diana Frechilla de la División de Neurociencias del “Centro de Investigación Médica Aplicada” (CIMA) de la Universidad de Navarra.

Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) y humedad (55-60%), con ciclos de luz/oscuridad de 12 h. Se cumplió la normativa dictada en el Real Decreto 223/1988 del 14 de Marzo sobre la protección de los animales para experimentación y otros fines científicos (BOE nº 67 de Marzo de 1998, pp 8509-8512).

Todos los experimentos se realizaron siguiendo las regulaciones éticas para el uso y cuidado de animales de laboratorio dictado por la Unión Europea (UE 08-88), y los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Experimentación animal de la UCM.

3.1. GENOTIPADO DE LOS RATONES TRANSGÉNICOS TgAPP

El genotipado de los animales se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando extractos de ADN procedente de la cola de los animales. Teniendo en cuenta que el Tg2576 (TgAPP) es una línea heterocigota, se utilizó el gen de inserción (PrP, de la proteína priónica) como control positivo de la reacción.

Extracción de ADN:

Los animales se genotiparon a los 30 días de su nacimiento. Para la disección de la cola (0,5 cm), los ratones fueron previamente anestesiados con 2% de isoflurano en oxígeno. La extracción del ADN se realizó por el método del fenol/cloroformo. A cada muestra se agregó 300 μl de tampón de lisis (Tampón NID: KCl 50mM; Tris-HCl pH 8,3 50mM; MgCl_2 50mM; gelatina 0,05%; NP-40 Sigma 0,45%; Tween 20 0,4%, proteinasa K 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y la mezcla se incubó 3 h a 56°C en agitación. Transcurrido el tiempo, se añadió 1 volumen de fenol y se agitó por inversión durante 5 min; se centrifugó 5 min a 7000 g, seguidamente se tomaron 250 μl de la fase acuosa. Se agregó 1 volumen de la mezcla fenol/cloroformo (1:1) se realizó el mismo procedimiento anterior. Se recuperó la fase acuosa en otro tubo y se añadió 1 volumen de cloroformo; a la última fase acuosa recuperada se adicionó 1/10 volumen de acetato de sodio 3 M y 1 volumen de isopropanol; la mezcla se agitó suavemente y se mantuvo a -20°C durante 30 min, se centrifugó a 7000 g durante 5 min, se desechó el sobrenadante y se lavó con etanol 70%. Las muestras se secaron a temperatura ambiente para eliminar las trazas de etanol y finalmente fueron resuspendidas

en 30 μ l de tampón TE (Tris 10 mM-EDTA 1mM). La pureza y la concentración del ADN se determinó por espectroscopia a 260 y 280 nm.

Amplificación de genes:

Mediante PCR se amplificaron los genes PrP y APP. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en el genotipado se detallan en la Tabla 11.

Tabla 11. Oligonucleótidos para el genotipado de los animales

Oligo	Secuencia
PrP-sentido*	CCTCTTTGTGACTATGTGGACTGATGTCGG
PrP-antisentido	GTGGATACCCCCTCCCCAGCCTAGACC
APP-antisentido	CCAGATCTCTGAAGTGAAGATGGATG.

La mezcla reactiva se preparó para un volumen final de 25 μ l conteniendo 100 ng de ADN purificado, tampón de reacción KCl 50 mM, Tris/HCl 10 mM (pH 9 a 25°C), triton X-100 0,1% (v/v), MgCl₂ 1,5 mM, 200 μ M de cada desoxinucleótido (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 25 pmoles de cada cebador y 1 U de Taq ADN polimerasa. Las condiciones de cada ciclo de reacción fueron programadas en un termociclador (Perkin Elmer 2400); desnaturalización a 94°C durante 90 s, hibridación 60°C durante 60 s, y polimerización a 72°C durante 90 s. Estas condiciones se repitieron durante 39 ciclos, finalizando con un ciclo de 72°C durante 7 min. En todos los casos se consideraron controles negativos de la reacción de PCR (sin ADN molde) y controles positivos del gen APP. Los productos de PCR obtenidos se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en tampón TBE 0,5X a voltaje constante de 70 V. Posteriormente se tiñeron con GelRed. En la Figura 25, se pueden observar el perfil de amplificación tanto para los ratones transgénicos como los WT.

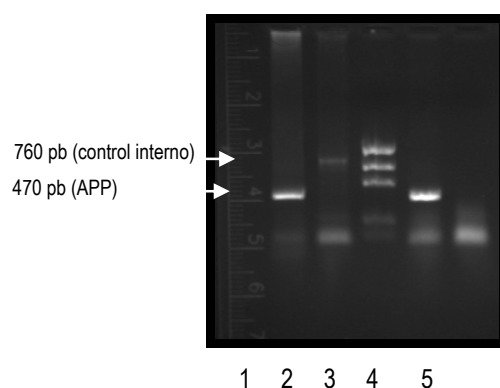


Figura 25. Genotipado de los ratones por PCR. (1) y (4) ratones transgénicos Tg2576: amplicón de 470 pb correspondiente al gen APP; (2) ratón wild type: amplicón 760 pb del gen PrP; (3) Marcador Mass Ruler #170-8207, (5) Control de reacción sin ADN molde.

3.2. PROTOCOLO DE ADMINISTRACIÓN DE LOS FLAVONOIDES A LOS ANIMALES

En base a las propiedades antioxidantes y antiamiloidogénicas observadas en los experimentos *in vitro* y en la línea celular transgénica SH-SY5Y APP^{swe}, se decidió evaluar el efecto neuroprotector de quercetina y rutina en este modelo animal.

Una vez obtenida la colonia, los animales se distribuyeron en los siguientes grupos (n= 8) tanto en machos como en hembras:

1. WT
2. TgAPP-Control
3. TgAPP-Quercetina 4 semanas
4. TgAPP-Rutina 4 semanas

Los flavonoides en estudio se incorporaron a una dieta regular (Harlan Ibérica, Barcelona, España) a una concentración de 200 ppm que corresponde aproximadamente a 28 mg de flavonoide/kg para ratones macho y 30 mg/kg para ratones hembra, el esquema de tratamiento se muestra en la Figura 26.

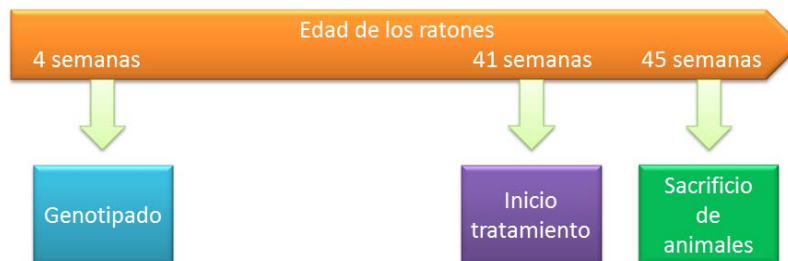


Figura 26. Esquema de tratamiento de los ratones transgénicos Tg2576.

Los animales dispusieron de la dieta y el agua *ad libitum*. Al finalizar los tratamientos, los animales fueron sacrificados y se aisló el hipocampo y la corteza cerebral, áreas cerebrales en las que se realizaron las diferentes determinaciones. Adicionalmente se realizó un tratamiento con rutina a la misma dosis durante 4 semanas en ratones hembra que culminó cuando los animales tuvieron 16 meses de edad, con la finalidad de evidenciar los agregados amiloideos característicos de esta línea transgénica y el efecto de rutina sobre los mismos.

Al finalizar los tratamientos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se procedió a la extracción del cerebro entero, a continuación se aislaron los hipocampos y 6 porciones de corteza cerebral en diferentes tubos, las muestras se almacenaron inmediatamente a -80°C hasta su utilización.

El cerebro entero de algunos animales se utilizó para la realización de cortes histológicos, para lo cual una vez sacrificados por dislocación cervical los cerebros fueron congelados por inmersión en isopentano a -80°C . Inmediatamente después, se procedió a la realización de cortes coronales del cerebro (30 μm de espesor) desde el bulbo olfatorio hasta el cerebelo separados entre sí 120 micras en un criostato (Leica CM1850, Alemania) todo el procedimiento se realizó a -20°C . Estos cortes se recogieron en portaobjetos y se mantuvieron a -80°C hasta su análisis.

3.3. CAPTACIÓN DE ^{18}F -FLUORODEOXYGLUCOSA (^{18}F]-FDG) POR TOMOGRAFÍA POR EMISIÓN DE POSITRONES (PET) *IN VIVO*

Para llevar a cabo las adquisiciones tomográficas, los animales estuvieron en ayunas durante al menos 8 h. A continuación, los ratones fueron inyectados con el radiotrazador emisor de positrones ^{18}F]-FDG (aprox. 300 μCi -11,1 MBq- en un volumen de 0.2 ml, i.p.; Instituto Tecnológico PET). Tras un período de incorporación de 45 min, se procedió a llevar a cabo la adquisición tomográfica. Para ello y con el fin de asegurar la inmovilidad durante todo el proceso de adquisición, los animales fueron anestesiados mediante inhalación con isoflurano en oxígeno (5% inducción y 2% mantenimiento). Una vez situado el animal se procedió a realizar la adquisición PET (30 min), para ello se empleó un tomógrafo PET específico para animales de experimentación (Albira PET, Oncovision, España).

Las regiones de interés analizadas fueron: corteza frontal, corteza parieto-temporal, estriado e hipocampo. Con el fin de delimitar las estructuras cerebrales en estudio, las imágenes PET se corregieron con MRI potenciada en T2 (Bruker Biospin, Alemania). Posteriormente, sobre dicha MRI se trazaron los volúmenes de interés (VOIs) correspondientes a las estructuras cerebrales a analizar. La actividad metabólica cerebral se expresa en KBq/cm^3 . Todo este proceso de visualización, delimitación de VOIs y cuantificación se realizó con el programa PMOD 2.9 (PMOD Technologies, Suiza).

3.4. CAPTACIÓN DE ^{18}F -FDG *EX VIVO* MEDIANTE AUTORADIOGRAFÍA

El proceso de administración del radiotrazador fue básicamente similar al descrito anteriormente con la diferencia en que la dosis inyectada de trazador fue de 500 μCi en vez de 300 μCi . Pasados 45 min. correspondientes a la captación cerebral de ^{18}F -FDG, los animales fueron sacrificados y los cerebros fueron rápida y cuidadosamente extraídos y congelados por inmersión en isopentano a -40°C .

Inmediatamente después, se procedió a la realización de cortes coronales del cerebro (30 μm de espesor) desde el bulbo olfatorio hasta el cerebelo separados entre si por 120 μm , todo el procedimiento se realizó a -20°C en un criostato. Los cortes histológicos se recogieron en portaobjetos, los cuales se expusieron a película de autorradiografía (Agfa Curix RP2 Plus, Mertsel, Bélgica) durante 1 h. Las películas se revelaron de forma manual y se dejaron secar en corriente de aire caliente. Las impresiones de la película, fueron capturadas digitalmente con una resolución de 1728 x 1296 píxeles (DC300F Leica, Alemania).

Obtención de imágenes 3D

Las imágenes digitalizadas correspondientes a cada uno de los cortes coronales, fueron procesadas con el software ImageJ 1.37 (Wayne Rasband, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD, EE.UU.). A continuación, usando el software de análisis PMOD, se crearon los volúmenes de interés (VOIs) con isocurvas de nivel sobre las imágenes autorradiograficas para generar una máscara de las áreas cerebrales y para eliminar la posible contribución de las secciones adyacentes.

Con el fin de crear una imagen 3D, todos los cortes de cada ratón se importaron como una pila de imágenes utilizando PMOD. Básicamente, las secciones adyacentes se alinean con las secciones inmediatamente precedente y posterior usando para ello la herramienta “corrección de movimiento” del módulo Fusión presente en el software. Para preservar las formas de las secciones se eligió una transformación rígida y se utilizó la suma diferencia al cuadrado como disimilitud métrica para la optimización. Después de la inspección visual del registro automático, se realizó una alineación manual de algunos cortes en caso de que fuera necesario. Finalmente se obtuvo una imagen 3D autorradiografica para cada animal, el cual se grabó para su posterior análisis (en formato analyze).

Análisis

Con el fin de cuantificar la captación de ^{18}F -FDG en las áreas en estudio, primero se procedió al correregistro de las imágenes 3D con un *template* de resonancia cerebral de ratón. A continuación se aplicaron los VOIs de las regiones de estudio, obteniéndose la densidad óptica de las distintas estructuras analizadas. Todo este proceso de visualización, correregistro, delimitación y cuantificación de VOIs se realizó con el software PMOD.

Para corregir las variaciones en la dosis inyectada, el tiempo de incorporación, el tiempo hasta proceder al revelado de la película, las variaciones en peso y glucemia, los datos de captación se normalizaron frente a una estructura de referencia. En este caso, se eligió la protuberancia ya que de todas las estructuras de referencia, es la que se considera la más adecuada en el ámbito clínico (Minoshima et al., 1995).

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante ANOVA de 1 vía (Sigmastat 3.0). En caso de encontrar diferencias en algún factor se eligió el procedimiento de Student-Newman-Keuls como test *a posteriori* para determinar diferencias entre los cuatro grupos experimentales.

3.5. EXPRESIÓN DE RECEPTORES IONOTRÓPICOS DE GLUTAMATO

Autorradiografía ^3H -AMPA

Para el marcaje de los receptores glutamatérgicos de tipo AMPA, se utilizó el ligando tritado ^3H -AMPA (Perkin Elmer, EEUU). Antes de la incubación con el ligando se procedió a una preincubación de los cortes con tiocianato potásico 100 mM disuelto en Tris-acetato 50 mM pH de 7,2 a 4°C. La preincubación se repitió 3 veces durante 10 min cada una de ellas. Tras la preincubación, se realizó la incubación de los cortes con la misma solución añadiendo el ligando tritado en una concentración de 10 nM durante 45 min a 4°C. Después de esos 45 min se realizó el lavado 4 veces en el tampón de incubación sin el ligando tritado durante 4 s y, posteriormente, 2 veces en una solución de glutaraldehído en acetona al 2,5% durante 2 s.

Después del marcaje, los cortes se secaron en la estufa a 37°C y se dispusieron en los cassettes junto con una película autorradiográfica (Biomax MR, Kodak) de alta resolución durante 10 semanas. Tras ese tiempo, se revelaron de forma manual.

Autorradiografía ^3H -MK801

Este ligando se une a los receptores glutamatérgicos tipo NMDA. Para ello se preincubaron los cortes coronales en Tris 50 mM con glutamato 50 μM , glicina 30 μM y espermidina 50 μM con un pH 7,2 a 4°C. Después de la preincubación, los cortes se sumergieron en un solución similar con adición del ligando a 3,3 nM durante 1 h a temperatura ambiente. Tras la incubación, se lavaron los cortes 2 veces con la solución de incubación sin glutamato durante 5 min cada lavado y finalmente con agua destilada a 4°C durante 1 s. Una vez finalizado el protocolo los portaobjetos se secaron en la estufa a 37°C y se expusieron a una película autorradiográfica (Biomax MR, Kodak) de alta resolución durante 10 semanas antes de proceder al revelado.

Autorradiografía ^3H -Kainato

El ligando ^3H -kainato se une a los receptores glutamatérgicos de kainato. Los cortes se preincubaron en una solución de Tris-citrato 50 mM y acetato cálcico 10 mM a un pH de 7,1 a 4°C. La preincubación se repitió 3 veces durante 10 min cada una. Tras ese tiempo se incubaron, se introducen los cortes en esa misma solución, esta vez con el ligando radiactivo a una concentración de 9,4 nM durante 45 min a 4°C de temperatura. Una vez finalizada la incubación, se realizó el lavado en el tampón de incubación sin ligando 3 veces durante 4 s a 4°C y otras 2 veces con glutaraldehído en acetona al 2,5% durante 2 s cada una de ellas. Posteriormente, los portaobjetos se secaron en la estufa a 37°C. Una vez secos se pusieron en un *cassette* junto con una película autorradiográfica (Biomax MR, Kodak) de alta resolución. Tras 12 semanas de exposición, la película fue revelada de forma manual.

3.6. TINCIÓN CON FLUORO-JADE C

La tinción con Fluoro-Jade C es una técnica que permite identificar de manera selectiva neuronas que están degenerando y sus proyecciones (dentrías distales, axones y terminales axónicas), en secciones de tejido independientemente de la causa de dicha neurodegeneración. Fluoro-Jade C es un derivado aniónico de fluoresceína con un peso molecular de 823 daltons y un pico de excitación máximo a 485 nm (azul) y un pico de emisión máximo a 525 nm (verde), ambas propiedades son pH dependientes. Para que el marcaje sea específico debe prepararse en un medio ácido (pH 3-4) ya que se favorece la intensidad de la luz emitida. El proceso seguido es el descrito por Schmued y col. (2005) con mínimas modificaciones (Schmued et al., 2005).

Soluciones de trabajo:

- Tampón fosfato 0,1 M pH 7,4
- Formaldehído 4% en tampón fosfato

- Alcohol básico: NaOH 1% en etanol 80%
- Etanol 70%
- Permanganato de potasio al 0,06%
- Ácido acético 0,1%
- Fluoro-Jade C y DAPI al 0,0001% en ácido acético 0,1%: esta solución se preparó en el momento a partir de una solución stock de 0,01% (a 4°C protegido de la luz, estable durante 3 meses)
- Solución de montaje Fluoromount (Sigma)

Procedimiento:

Las secciones cerebrales de 30 μm se secaron previamente para ser fijados en una solución de formaldehído 4% en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 durante 10 min, se lavó dos veces en tampón fosfato, luego se introdujeron en alcohol básico durante 5 min, transcurrido el tiempo se incubó en etanol al 70% durante 2 min, se lavaron con agua durante 2 min, y a continuación se incubó sobre permanganato de potasio al 0,06% durante 10 min, esto con el objetivo de disminuir el fondo de la tinción, además evitar la pérdida de señal fluorescente. Tras esta tinción, las secciones cerebrales se lavaron con agua durante 1 min, seguidamente se incubaron en la solución de Fluoro-Jade C y DAPI al 0,0001% durante 10 min, transcurrido el tiempo se lavó con agua destilada 3 veces durante 1 min en cada cambio, el exceso de agua se retiró con papel y se añadió 1 gota de Fluoromount, se dejó secar durante 1 h, para evitar las desecación los bordes fueron sellados con esmalte de uñas. Las secciones se examinaron en el microscopio epifluorescencia Zeiss Axioplan-2, usando el sistema de filtros de (Excitación 485 nm ; Emisión 525 nm). Para observar el marcaje nuclear azul por DAPI se excitó con luz UV.

3.7. TINCIÓN DE LOS AGREGADOS DE βA UTILIZANDO LA TIOFLAVINA T

El método se fundamenta en la capacidad de la tioflavina T (ThioT), un colorante tiazolidínico, de intercalarse entre los agregados de βA , produciendo un compuesto fluorescente proporcional a la cantidad de agregado.

Soluciones de trabajo:

- Tampón fosfato 0,1 M pH 7,4
- Formaldehído 4% en tampón fosfato
- Solución stock de Hematoxilina Gill 3X: 25 ml de etilenglicol se disolvieron en 75 ml de agua destilada, sobre esta solución se adicionó 600 mg de hematoxilina, 60 mg de iodato de sodio, 8 g de sulfato de aluminio y 2 ml de ácido acético glacial, se dejó en agitación durante 1 h a temperatura ambiente y se filtró
- Solución de trabajo de Hematoxilina Gill: La solución anterior se diluyó en la proporción 1:5 en agua destilada antes de su uso
- Tioflavina T 0,25% en agua destilada
- Etanol 70%
- Fluoromount

Procedimiento:

Los portaobjetos conteniendo las secciones cerebrales de 30 μm una vez descongelados y secos, fueron fijados en una solución de formaldehído 4% en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 durante 10 min, se lavó dos veces en tampón fosfato, posteriormente se introdujeron en la solución de trabajo de hematoxilina Gill durante 30 s, se lavó con agua corriente durante 5 min, adicionalmente se realizó un lavado en agua destilada y se incubó en una solución de tioflavina T 0,25% durante 10 min, luego se introdujo en una solución de etanol al 70% durante 5 min para favorecer la diferenciación de la tinción, se lavó en agua destilada 2 veces, el exceso de agua se retiró con papel y se añadió 1 gota de Fluoromount, se dejó secar durante 1 h, para evitar la desecación los bordes fueron sellados con esmalte de uñas. Las

secciones se examinaron en el microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioplan-2, usando el sistema de filtros (Excitación 485 nm; Emisión 525 nm).

4. DETERMINACIONES EN CÉLULAS APP^{swe}, CORTEZA E HIPOCAMPO DE RATONES TgAPP

4.1. GLUTATION

Para determinar el glutatión es necesario medir tanto su forma reducida como su forma oxidada e interpolar en una curva patrón del glutatión reducido, la cual es lineal entre 0 y 5 nmol/pocillo. Se utilizó la curva patrón de GSH porque lo que medimos en forma directa en este ensayo es un compuesto fluorescente formado por la reacción del O-ftalaldehído (OPA) con el GSH (Senft et al., 2000).

Soluciones de trabajo:

- Tampón redox quenching (RQB): HCl 20 mM, DTPA 5 mM, L-ascórbico 10 mM
- Tampón RQB-ácido tricloroacético (ATC): ATC al 5% disuelto en RQB
- N-etilmaleimida (NEM) 3,15 mM, disuelto en RQB
- Tampón fosfato potásico 1M pH = 7
- Tampón fosfato potásico 0,1M pH = 6,9
- Ditionito sódico (DT) 95,62 mM disuelto en RQB
- OPA 5 mg/ml disuelto en metanol
- GSH 10 mM disuelto en RQB-ATC

Procedimiento:

Al pellet celular de media placa petri grande, conteniendo aproximadamente $4,5 \cdot 10^6$ de células, se agregó 120 µl de tampón RQB-ATC (Burbujearado previamente con argón durante 15 min en hielo). En el caso de tejido cerebral se adicionó RQB-ATC a una concentración de 25 mg/ml. Las muestras se resuspendieron por sonicación durante 10 s, se centrifugaron a 12000 g durante 10 min a 4°C y se recogieron los sobrenadantes donde se cuantificaron los niveles de glutatión. Los pellets se disolvieron en vórtex hasta su completa disolución en 240 µl de NaOH 0,1 M, para medir la concentración de proteínas por el método del ácido bicinónico (BCA). En el sobrenadante obtenido se determinaron los niveles de GSH y GSSG siguiendo los protocolos presentados en las Tablas 12 y 13, respectivamente.

Tabla 12. Protocolo para la determinación del glutatión reducido (GSH):

	A (Blanco) en µl	B en µl
Muestra	10	10
ATC-RQB	30	30
NEM	5	5 (RQB)
Tampón fosfato 1 M	35	35
Se incubó 15 min a temperatura ambiente y con agitación.		
Tampón fosfato 0,1 M	150	150
OPA	10	20

Tabla 13. Protocolo para la determinación del glutatión oxidado (GSSG):

	A (Blanco) en µl	B en µl
Muestra	40	40
NEM	5	5
Tampón fosfato 1 M	35	35
Se incubó 15 min a temperatura ambiente y con agitación.		
DT	5 (RQB)	5
Se incubó una hora a temperatura ambiente.		
Tampón fosfato 0,1 M	150	150
OPA	10	20

En ambos casos se incubó 30 min a temperatura ambiente y finalmente se realizó la lectura a λ_{exc} 360 nm y λ_{em} 460 nm en el Fluorímetro FLx800.

4.2. SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

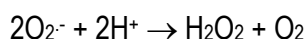
El contenido en TBARS fue usado como índice de lipoperoxidación. Tras el tratamiento de 24 h con quercetina y rutina, el pellet celular de media placa se resuspendió en 100 μ l de tampón fosfato 50 mM pH 7,4. En el caso de tejido cerebral se adicionó el tampón fosfato hasta alcanzar una concentración de 25 mg/ml. La suspensión celular se homogenizó por sonicado durante 10 s. A 30 μ l del homogenado se adicionó 250 μ l de ácido fosfórico al 1%, 75 μ l de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,6%. La mezcla reactiva se incubó a 100°C en baño de agua durante 45 min. Transcurrido el tiempo se enfrió en un baño de hielo y seguidamente se centrifugó a 3000 g durante 10 min a 4°C. Se tomaron 150 μ l del sobrenadante de cada muestra y se cuantificó la fluorescencia a λ_{exc} 485 y λ_{em} 530 nm en el Fluorímetro FLx800. Paralelamente se preparó una curva de calibración MDA como estándar. Los resultados fueron expresados en nmol de MDA/mg de proteínas.

4.3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS PRINCIPALES ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Para la determinación de la actividad enzimática, tras 24 h de tratamiento, el pellet celular de dos placas petri se resuspendió en 300 μ l de tampón de lisis conteniendo tampón fosfato 50 mM pH 7,4 y antiproteasas (EDTA 1mM, PMSF 1 mM, peptatina 1 μ g/ml y leupeptina 1 μ g/ml). En el caso de tejido cerebral se adicionó el tampón de lisis hasta alcanzar una concentración de 50 mg/ml. La suspensión celular se sonicó durante 30 s en baño de hielo y el homogenado se centrifugó a 10 000 g durante 15 min a 4°C, recogiendo el sobrenadante para la determinación de la actividad enzimática de las enzimas antioxidantes.

Superóxido Dismutasa (SOD)

Fue medida por el método de Marklund y Marklund (1974), basado en la capacidad que tiene la SOD de inhibir la autooxidación del pirogalol a pirogalina y radical superóxido que autocataliza la oxidación del pirogalol en medio alcalino (Marklund and Marklund, 1974).



Soluciones de trabajo:

- Tampón de reacción: Tris 50 mM + ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) 1 mM pH 8,2
- Pirogalol 24 mM disuelto en HCl 10 mM
- Tampón fosfato 50 mM pH 7,4

Procedimiento:

La reacción no catalizada contenía 160 μ l del tampón de reacción, 30 μ l de tampón fosfato 50 mM y 10 μ l de pirogalol 24 mM. Se ajustó la cantidad de pirogalol hasta que en la reacción control se produjeran incrementos de absorbancia/min en el rango de 0,020 – 0,050. La reacción catalizada contenía 160 μ l de tampón de reacción, 30 μ l de extractos celulares totales de cada una de las muestras y 10 μ l de pirogalol 24 mM. Se mezcló bien y se realizó la lectura a 405 nm en un lector de placas DigiScan durante 3 min con lecturas cada 10 s, con un retraso inicial de 20 s.

Cálculos:

Una unidad de SOD es la cantidad de enzima que inhibe la oxidación de pirogalol en un 50%.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Abs. Control} - \text{Abs. Problema}}{\text{Abs. Control}} \times 100$$

$$\text{Actividad SOD (U/mg proteína)} = \frac{\% \text{ Inhibición} \times 0,2 \times F}{50 \times V_m \times P}$$

F= Factor de dilución

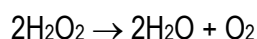
0,2 = Volumen final de la reacción

V_m = Volumen de muestra (0,030 ml)

P= mg de proteína/ml

Catalasa (CAT)

La técnica utilizada fue la descrita por Hugo Aebi (1974). Este método se basa en el seguimiento de la descomposición de H₂O₂ para dar H₂O y O₂ mediante espectrofotometría a 240 nm como consecuencia de la actividad catalítica de la catalasa (Aebi, 1984).



Soluciones de trabajo:

- Tampón de reacción: Tampón fosfato 50 mM pH 7,4
- H₂O₂ 14 mM en tampón fosfato 50 mM pH 7,4

Procedimiento:

A 870 µl de tampón fosfato 50 mM pH 7,4 conteniendo H₂O₂ 14 mM, se adicionó 30 µl de los extractos celulares totales de cada una de las muestras. La descomposición del H₂O₂ se determinó directamente por monitorización de la disminución de la absorbancia del H₂O₂ a 240 nm, a 25°C en un espectrofotómetro UV-VIS (Halo RB-10).

Cálculos:

$$\text{Actividad CAT (IU/mg proteína)} = \frac{\Delta \text{Abs.}/\text{min} \times 0,9 \times F}{3,6 \times 10^{-3} \times V_m \times P}$$

F= Factor de dilución

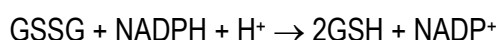
0,9 = Volumen final de la reacción

V_m = Volumen de muestra (0,030 ml)

P= mg de proteína/ml

Glutation Reductasa (GR)

La actividad de esta enzima se evalúa de acuerdo al método de Massey y Williams (1965). La GR cataliza la reducción de GSSG, utilizando NADPH como cofactor, dando lugar a dos moléculas de GSH. La tasa de disminución de la absorbancia ocasionada por la oxidación de NADPH a NADP⁺ se sigue espectrofotométricamente a 340 nm, siendo directamente proporcional a la actividad enzimática de GR (Massey and Williams, 1965).



Soluciones de trabajo:

- Tampón de reacción: Tampón fosfato 50 mM pH 7.4 con EDTA 6.3 mM
- NADPH 4 mM
- GSSG 53,3 mM

Procedimiento:

Para cuantificar la actividad de GR, se añadieron 30 μ l de cada muestra sobre 735 μ l de tampón de reacción. Se adicionó GSSG y NADPH a las concentraciones finales de 250 μ M y 3 mM, respectivamente. La absorbancia se midió durante 5 min con un retraso inicial de 30 s. La reacción no catalizada se realizó en ausencia de muestra problema cuyo volumen se reemplazó con tampón fosfato y se evaluó en las mismas condiciones anteriores, para determinar la reacción en ausencia de enzima. La absorbancia se midió a 340 nm durante 5 min en un espectrofotómetro UV-VIS Halo RB-10.

Cálculos:

$$\text{Actividad GR (}\eta\text{moles NADPH/min mg proteína)} = \frac{\Delta\text{Abs.}/\text{min} \times 0,9 \times F}{6,22 \times 10^{-3} \times V_m \times P}$$

F= Factor de dilución

0,9 = Volumen final de la reacción

$6,22 \cdot 10^{-3}$ ml. $\eta\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ = Coeficiente de extinción molar del NADPH

V_m = Volumen de muestra (0,030 ml)

P= mg de proteína/ml

Glutation Peroxidasa selenio dependiente (GPx-Se)

Se utilizó el método de Barja de Quiroga y col. (1990), la técnica está basada en la oxidación del GSH por el H_2O_2 en una reacción catalizada por la GPx-Se que contiene la muestra (Reacción 1). El GSH se mantiene a una concentración constante durante la reacción mediante la adición de GR y NADPH; así, el GSSG se reduce formando GSH y el NADPH es oxidado y consumido durante la reacción (Reacción 2) (Barja de Quiroga et al., 1990).



La oxidación del NADPH a NADP^+ es monitorizada mediante la disminución de la absorbancia a 340 nm.

Soluciones de trabajo:

- Solución reactiva: 7 mg de azida (para inhibir la actividad de catalasa), 10 mg de EDTA, 33 mg de GSH, 5 mg de NADPH, 27 UI de GR se prepararon en 25 ml de tampón fosfato 50 mM pH 7,4 previamente burbujeado con argón.

- H_2O_2 10 mM en tampón fosfato 50 mM pH 7,4

Procedimiento:

La actividad de GPx-Se se midió tras preincubar durante 4 min 820 μ l de la solución reactiva con 50 μ l de los extractos proteicos de cada muestra problema, tras los cuales se añadió 30 μ l del sustrato H_2O_2 10 mM. La reacción no catalizada se realizó en ausencia de muestra cuyo volumen se reemplazó con tampón fosfato y se evaluó en las mismas condiciones anteriores, ya que siempre existe reacción en ausencia de enzima. La absorbancia se midió a 340 nm durante 4 min en un espectrofotómetro UV-VIS Halo RB-10.

Cálculos:

$$\text{Actividad GPx-Se (}\eta\text{moles NADPH/min mg proteína)} = \frac{\Delta\text{Abs.}/\text{min} \times 0,9 \times F}{6,22 \times 10^{-3} \times V_m \times P}$$

F= Factor de dilución

0,9 = Volumen final de la reacción

$6,22 \cdot 10^{-3} \text{ ml} \cdot \eta \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ = Coeficiente de extinción molar del NADPH

V_m = Volumen de muestra (0,050 ml)

P= mg de proteína/ml

4.4. NIVELES DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT

Soluciones de trabajo:

- Tampón de lisis: Tris 50 mM pH=8, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, tritón X-100 1%, SDS 0.1%, desoxicolato de sodio 0.5%, PMSF 2 mM, leupeptina 10 µg/ml, peptatina 10 µg/ml, aprotinina 10 µg/ml, NaF 10 mM, Na₃VO₄ 1 mM.

Procedimiento:

Células: El pellet celular correspondiente a media placa petri conteniendo aproximadamente $4,5 \cdot 10^6$ de células se resuspendió en 200 µl de tampón de lisis.

Cerebros: A una cantidad conocida de tejido se adicionó el tampón de lisis en la proporción 1:10.

Las muestras se homogenizaron durante 30 s utilizando el motor Cordless (Pellet pestle, Sigma-Aldrich), seguidamente se incubó en hielo durante 15 min para favorecer la lisis celular, transcurrido el tiempo de centrifugó a 10 000 g durante 15 min, y en el sobrendante se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS (PAGE-SDS)

Soluciones de trabajo:

- Solución A: Acrilamida 30%, bis-acrilamida 0,8%.
- Solución B: Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8; SDS 0,4%.
- Solución C: Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; SDS 0,4%.
- Persulfato amónico (APS) 10%
- Tampón de electroforesis: Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%, pH 8,3.
- Tampón de carga 5 X: Tris-HCl 60 mM pH 6,8, glicerol 25%, SDS 2%, 2-mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1%.

Equipo

- Mini protean II (Bio-Rad)

Procedimiento

Hemos utilizado geles de poliacrilamida al 7,5 y 10%, según el tamaño de la proteína a analizar. El protocolo para la preparación de los geles de poliacrilamida SDS en tampón glicina empleados se resume en la Tabla 14.

Tabla 14. Protocolo para la preparación de geles de poliacrilamida-SDS

Reactivos	Gel de empaquetamiento 5%	Gel separador 7,5%	Gel separador 10%
Solución A (ml)	0.67	2.50	3.33
Solución B (ml)	-	2.50	2.50
Solución C (ml)	1.00	-	-
Agua destilada (ml)	2.30	5.00	4.17
APS (µl)	30	50	30
TEMED (µl)	5	10	10

Una vez polimerizado el gel de poliacrilamida, 10 µg del extracto de proteínas se mezclaron con el tampón de carga 5X. A continuación las muestras se calentaron a 100°C durante 4 min, y se cargaron en los pocillos del gel de empaquetamiento. La electroforesis se realizó en tampón Tris-HCl 25 mM a pH 8,4, glicina 0,19 M y SDS 0,1% a 100 mV durante los 6 primeros min y a 200 mV durante aproximadamente 45 min.

Western-blot

Soluciones de trabajo:

- Tampón de transferencia: Tris base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, pH 8,1-8,4.
- PBS: Na₂HPO₄ · 2H₂O 80 mM, NaH₂PO₄ · 2H₂O 20 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5
- PBS-Tween: PBS + Tween 20 (0,1%).

Equipo

- Analizador de imagen. Modelo: Multi Genius. Bio Imaging Systems (Syngene)

Procedimiento

Una vez completado el recorrido tras la separación según el peso molecular, se equilibró el gel y la membrana en tampón de transferencia (previamente enfriado a 4°C) durante 15 min. Se montó el sistema y se realizó la transferencia a 350 mA durante 60 min. Transcurrido el tiempo, se separó el gel de la membrana, se llevó a cabo la tinción del gel con azul de Coomassie para verificar la correcta migración de las proteínas. Por otro lado, la membrana se bloqueó con leche en polvo al 10% en PBS durante al menos 1 hora y en agitación. Transcurrido el tiempo, se lavó la membrana con PBS durante 30 min con cambios cada 10 min. A continuación se incubó con el anticuerpo primario (Tabla 15) durante toda la noche (agitación constante y 4°C). Las diluciones de los anticuerpos variaron en cada caso y se realizó en función del anticuerpo a utilizar.

Tabla 15: Anticuerpos utilizados para la identificación de proteínas mediante western blot.

Proteína	Especificidad	Casa comercial	Dilución	Peso molecular (kDa)
β-Actina	Ratón/humano	Sigma	1:50 000	48
ADAM-10	Ratón/humano	Santa Cruz	1:1000	60
APP	Ratón/humano	Chemicon	1:40 000	110, 120, 130
CAT	Ratón/humano	Sigma	1:40 000	60
GPx	Ratón/humano	Abcam	1:2000	22
GR	Ratón/humano	Abcam	1:2000	58
SOD	Ratón/humano	Genscript	1:10 000	23
PARP	Humano	Transduction	1:2000	113

Al día siguiente se lavó la membrana con PBS-Tween durante 30 min con cambios cada 10 min y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a peroxidasa durante al menos 1 hora. Posteriormente se lavó la membrana con PBS-Tween durante al menos 2 h con cambios cada 10 min. La detección de la proteína correspondiente se realizó por quimioluminiscencia (ECL).

4.5. EXPRESIÓN GÉNICA POR PCR EN TIEMPO REAL

Extracción y purificación del ARN_{total}

Soluciones de trabajo:

- Tampón de lisis: Triomol®
- Agua DEPC: Agua bidestilada tratada con DEPC al 0,1% y luego autoclavada para eliminar e inactivar el DEPC

Procedimiento:

Células: El pellet celular correspondiente a media placa petri conteniendo aproximadamente $4,5 \cdot 10^6$ de células se resuspendió en 400 μ l de tampón de lisis.

Cerebros: A una cantidad conocida de tejido se adicionó el tampón de lisis Triomol en la proporción 1:10.

Las muestras se homogenizaron 30 s utilizando el motor Cordless (Pellet pestle, Sigma-Aldrich), se incubaron durante 5 min a 25°C para permitir la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas. A continuación, se adicionó 0,2 ml de cloroformo por cada ml de triomol utilizado. Los tubos se agitaron vigorosamente durante 15 s y se incubaron a 25°C durante 3 min. Posteriormente, se centrifugaron a 11000 g durante 15 min a 4°C. Tras la centrifugación se obtuvieron tres fases, encontrándose el ARN en la superior.

Para aislar el ARN, se transfirió la fase superior a otro tubo y se precipitó añadiendo 0,5 ml de isopropanol. Tras mezclar bien el isopropanol y la solución acuosa por inversión, se incubó a temperatura ambiente durante 10 min para favorecer la precipitación, y se centrifugó a 12000 g durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes se eliminaron y los pellets fueron lavados con etanol al 75%, centrifugándose a 7500 g durante 5 min a 4°C. Los pellets se secaron a temperatura ambiente y se disolvieron en 50 μ l de agua DPCE. Para eliminar las trazas de ADN, se añadió 2,5 μ l de ADNasa (Libre de ARNasa) y se incubó a 37°C durante 30 min. Finalmente las muestras se calentaron a 64°C durante 5 min para inactivar la ADNasa.

Posteriormente se cuantificó la concentración de ARN en un espectrofotómetro UV-VIS, basándonos en la propiedad que tienen las bases nitrogenadas de absorber a 260 nm. Además, se determinó la absorción de las proteínas de la muestra a 280 nm, para calcular la razón de absorbancias A_{260}/A_{280} que da idea del nivel de contaminación de proteínas de la muestra. Se consideró una buena proporción de 1,7-2,1, por de bajo se este rango nos indicaría una contaminación con proteínas o fenol.

La determinación de su integridad y pureza se realizó mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con GelRed y visualizado bajo luz UV, donde, si el ARN está intacto, debemos observar dos bandas superiores correspondientes al ARN ribosómico (28S y 18S) y dos bandas inferiores que son el ARN transferente y el ARN ribosómico 5S. El ARN mensajero (ARNm) no aparece definido como una única banda, sino como un conjunto de bandas no discretas que van de 5 kilobases hasta 600 bases, no debemos observar bandas correspondientes a ADN genómico, lo cual indicaría que la ADNasa no actuó eficientemente (Figura 27). Verificando la integridad, pureza y concentración del ARN total, recién se procedió a la síntesis de ADN complementario.

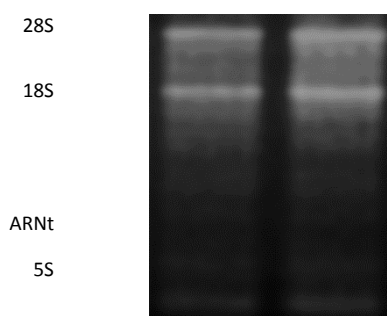


Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa de producto de extracción de ARN a partir de pellets celulares de APPswe. Se observan dos bandas superiores correspondientes al ARN ribosómico (28S y 18S) y dos bandas inferiores que son el ARN transferentes y el ARN ribosómico 5S. El ARNm aparece como un conjunto de bandas no definidas que van desde 5-600 kb.

Síntesis de ADN complementario (ADNc)

El ADNc es mucho más estable que el ARN y por lo tanto permite un manejo más cómodo y seguro de la muestra. El ADNc se sintetizó a partir del ARN por retrotranscripción, utilizando el kit First Strand ADNc Synthesis Kit for RT-qPCR (Fermentas Life Sciences).

Se partió de 2 μg de ARN_{total}, se adicionó agua tratada con DEPC hasta 11 μl y se añadió 1 μL de Random primers 10X, a continuación se incubó a 65°C durante 10 min para desnaturalizar el ARN. Transcurrido este tiempo, los tubos se llevaron inmediatamente a 4°C durante 5 min para evitar la renaturalización del ARN, a pesar de ~~se~~ ser una molécula de cadena sencilla, contiene estructuras secundarias intercatenarias que pueden interferir en la reacción de retrotranscripción, pudiendo impedir el correcto apareamiento de los cebadores.

La mezcla de reactivos para la síntesis de ADNc se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Mezcla de reactivos para la síntesis de ADNc

Reactivos	Volumen (μl)
Tampón RT 10X	4
Inhibidor ARNasa (20 U/ μl)	1
dNTPs 10 mM	2
Transcriptasa reversa (20 U/ μl)	1

Se adicionó 8 μl de la mezcla de reacción por muestra, se llevó todo el volumen al fondo de los tubos para incubarlos a 42°C durante 60 min. Finalmente la reacción se detuvo inactivando la transcriptasa reversa por calentamiento a 70°C durante 10 min.

PCR a tiempo real

La principal característica de la PCR a tiempo real es que el análisis de los productos se produce durante el proceso de amplificación, mediante la determinación de la fluorescencia. De esta forma, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo tubo o vial sin necesidad de ninguna acción posterior. Para la PCR a tiempo real, se utilizan termocicladores que son capaces de amplificar y detectar la fluorescencia simultáneamente. Nosotros hemos utilizado el termociclador de tiempo-real LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) (Figura 28).



Figura 28. LightCycler 1.5 ROCHE, sistema que detecta y cuantifica ácidos nucleicos.

En la Tabla 17 indicamos los reactivos necesarios para la realización de la PCR a tiempo real utilizando cebadores específicos de secuencia y colorante de unión al ADN (SYBR Green I) como sistema de detección.

Tabla 17. Mezcla de reactivos para una reacción de PCR a tiempo real

Componentes de la reacción	Volumen (μl)
Quantimix easy master mix 2X	10
Primer F 10 uM	1
Primer R 10 uM	1
BSA 10 mg/ml	1
ADNc	1
Agua grado PCR	6

Para el diseño de los cebadores de los distintos marcadores cuantificados, se utilizó el programa bioinformático Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) para lo cual hemos tomado las secuencias de ADNc de los genes de interés de la base de datos de libre acceso de Medline (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>). Los cebadores han sido suministrados por Sigma-Aldrich, la temperatura de hibridación y la secuencia de los diferentes cebadores utilizados, se muestra en la Tabla 18 y 19 para genes de *Homo sapiens* y *Mus musculus*, respectivamente.

Tabla 18. Cebadores para síntesis de ADNc para *Homo sapiens*.

GEN	Oligo (Sentido 5'-3')	Oligo (Antisentido 3'-5')	T _h	pb
hAPP	ACCGCTGCTTAGTTGGTGAG	GGTGTGCCAGTGAAGATGAG	55	113
hBACE-1	GCCCCAACGTCACCTGTGCGTGCC	AGCCAGCACCAAGCTGCAGGGA	65	207
hADAM-10	TTCAGGAAGCTCTGGAGGAA	TTCTCCTGGTGTGCACTCTG	60	202
hSOD-1	AGACGGGGTGTGTTTGCG	CACACGGCCTTCGTCGCCAT	65	114
hSOD-2	CCTTGCAGCGCAGCTGGGGT	GCCGCACACTGCCCGGCTCA	65	171
hCAT	GCCTGCTGAGGGTGGAGACCCACG	GCGCGGCCCGCTGCTCCTTC	65	131
hGPx	TTGACATCGAGCCTGACATC	ACTGGGATCAACAGGACCAG	60	213
hGRS	AGTGGGACTCACGGAAGATG	CCTGCAGCATTTTCATCACAC	60	200
hCSP3	TGGAATTGATGCGTGATGTT	GGCAGGCCTGAATAATGAAA	60	201
hCSP6	GCAATGAGCTCGGCCTCGGG	CAGGTGCCCGCCTTTCTGG	65	206
hPSME1	CCTCGGATTGAGGATGGTAA	GCTGCTTGGCTGCTTTAGTC	60	157
hPSMB2	TTTTACCGAGCAACGTAGGG	CCTTAGTGACGCCAGTTT	60	154
hPARP-1	CCAGCAGAAAGTCAAGAAGACTCTGGG	GGCGCACCTGGCCCTTTTCT	65	110
hGADPH	GAGCCGCGAGCCTCCGCTT	CCAGGCGCCAATACGACCA	65	149

Tabla 19. Cebadores para la síntesis de ADNc para *Mus musculus*.

GEN	Oligo (Sentido 5'-3')	Oligo (Antisentido 3'-5')	T _A	pb
huAPP	ACCGCTGCTTAGTTGGTGAG	GGTGTGCCAGTGAAGATGAG	55	113
BACE	CCACCAACCTTCGCTTGCCCA	CCAGCACACCAGTGCTCCC	65	119
ADAM-10	AGTGGAGCGAGAGGGAGGCG	CCGCCAGGAGAGGAGCAGA	65	163
GSR	TGTCAAAGGCGTCTATGCTG	GGCTGAAGACCACAGTAGGG	60	155
SOD-2	GCCTTCCCAGGATGCCGCTC	CGTCTGCTAGGCAGCGTCCG	65	136
CAT	TCTCCGGGTGGAGACCGCTG	CCCCTGCTCCTTCCACTGC	65	133
GPx-1	TTTGGTCTCCGGTGTGCGC	GGGCCGCTTAGGAGTTGCC	65	169
PARP-1	TAGAGCGGAGGGGGAGAGC	CACAGGCGCTTCAGGTGGGG	65	143
CASP3	TCATTGAGCCTGCCGGGGT	CTGGATGAACCACGACCCGTCC	65	176
CASP6	TCCAGGCCTGTCCGGGTAGC	GGACGCAGCATCCACCTGGG	65	107
IL1β	AGCCTCGTGCTGTCGGACCC	TGAGGCCCAAGGCCACAGGT	65	139
IFNγ	CCCACAGGTCCAGCGCCAAG	CCCACCCGAATCAGCAGCG	65	111
TNFα	CAAGGGACAAGGCTGCCCCG	GCAGGGGCTCTTGACGGCAG	66	109
GADPH	AGAAGGTGGTGAAGCAGGCATG	CGAAGGTGGAAGAGTGGGAGTT	64	111

Las condiciones de reacción para la amplificación de los genes de interés se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Condiciones para realizar la PCR a tiempo real

Tiempo y temperatura			
Desnaturalización inicial	45 ciclos		
	Desnaturalización	Hibridación	Elongación
Desnaturalización 10 min 95°C	95°C/3 s	Según la T _A de los cebadores/15 s	72°C/20 s

Finalmente las muestras fueron sometidas a un programa de melting: 95°C durante 15 s, 65°C durante 30 s y hasta 98°C a una velocidad de 0,1°C/s con registro continuo de fluorescencia.

Para la cuantificación de los niveles de ADNc, se ha utilizado el método de comparación del ciclo threshold (Ct) (Ramos et al., 2006), usando GADPH como *housekeeper*. La amplificación del *housekeeper* se hizo en paralelo con el gen analizado. Los valores de Ct fueron calculados utilizando el software 4.0 proporcionado por LightCycler (Roche Diagnostics). Este programa permite distinguir entre la fluorescencia debido a la amplificación de la muestra y debida al *background*. También se registraron las curvas de melting, la determinación de la temperatura de melting del fragmento amplificado permitió caracterizar el producto amplificado. El tamaño de las bandas fue comprobado en un gel de agarosa al 1,5%.

La variación de la expresión del gen en estudio con los diferentes tratamientos de quercetina y rutina, se expresó en función del control (Células APP sin tratamiento) y normalizando dicha expresión con los niveles del GADPH, representación que se conoce como el *Change Fold* y representa las veces que se modifica el gen de interés con los tratamientos con respecto a las células control.

$$\text{Change fold} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$-\Delta\Delta Ct = -(Ct_{\text{genTRATAMIENTO}} - Ct_{\text{GADPHTRATAMIENTO}}) - (Ct_{\text{genCONTROL}} - Ct_{\text{GADPHCONTROL}})$$

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

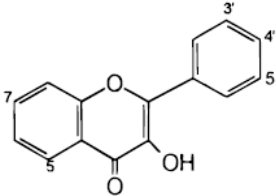
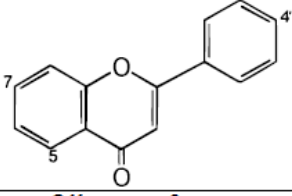
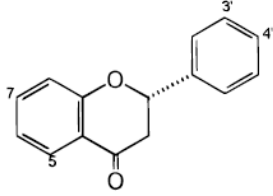
Todos los ensayos se realizaron al menos por duplicado y en tres experimentos diferentes. Los resultados obtenidos se expresan como la media \pm error estándar. Se realizó análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test de Newman-Keuls de comparación múltiple. Se consideraron significativos valores de $p < 0,05$. Para el análisis estadístico se utilizó el programa informático SigmaPlot 11.0.

“Estudio *in vitro* de la actividad
antiamiloidogénica y antioxidante
de los flavonoides”

1. OBJETIVOS DEL ESTUDIO *IN VITRO*

Para el presente trabajo se seleccionaron 6 flavonoides en base a la estructura química pertenecientes a tres grupos: flavonoles, flavonas y flavanonas. Dentro del grupo de los flavonoles se seleccionaron quercetina y sus derivados glicosídicos rutina y troxerutina. Del grupo de las flavonas se escogió diosmina e hidrosmina y por último dentro del grupo de las flavanonas se seleccionó la naringina. La estructura química de los flavonoides en estudio se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21. Estructura química y clasificación de los flavonoides en estudio

Flavonoles						
						
Compuesto	C3'	C4'	3	5	7	C2-C3
Quercetina	OH	OH	OH	OH	OH	Doble
Rutina	OH	OH	Rutinosa	OH	OH	Doble
Troxerutina	OCH ₂ CH ₂ OH	OCH ₂ CH ₂ OH	Rutinosa	OH	OCH ₂ CH ₂ OH	Doble
Flavonas						
						
Compuesto	C3'	C4'	3	5	7	C2-C3
Diosmina	OH	OCH ₃	H	OH	Rutinosa	Doble
Hidrosmina	OH	OCH ₃	H	OCH ₂ CH ₂ OH	Rutinosa	Doble
Flavanonas						
						
Compuesto	C3'	C4'	3	5	7	C2-C3
Naringina	H	OH	H	OH	Neohesperidosa	Simple

En este capítulo se evaluó el efecto antiamiloidogénico, antioxidante e inhibidor de acetilcolinesterasa de los flavonoides mediante técnicas *in vitro*, con la finalidad de elegir los flavonoides más activos.

En la Figura 29 se presentan las dianas farmacológicas seleccionadas en base a la teoría de la cascada amiloide, teniendo como alternativas: a) la búsqueda de inhibidores de β -secretasa y γ -secretasa para impedir la formación del péptido β A y así reducir la formación de placas amiloides; b) agentes que inhiban la agregación del péptido y/o que disgreguen los agregados de β A ya formados, c) moléculas capaces de inhibir la generación de radicales libres y de este modo prevenir la posterior neurodegeneración y d) moléculas capaces de inhibir la enzima acetilcolinesterasa para prevenir y/o revertir el déficit colinérgico

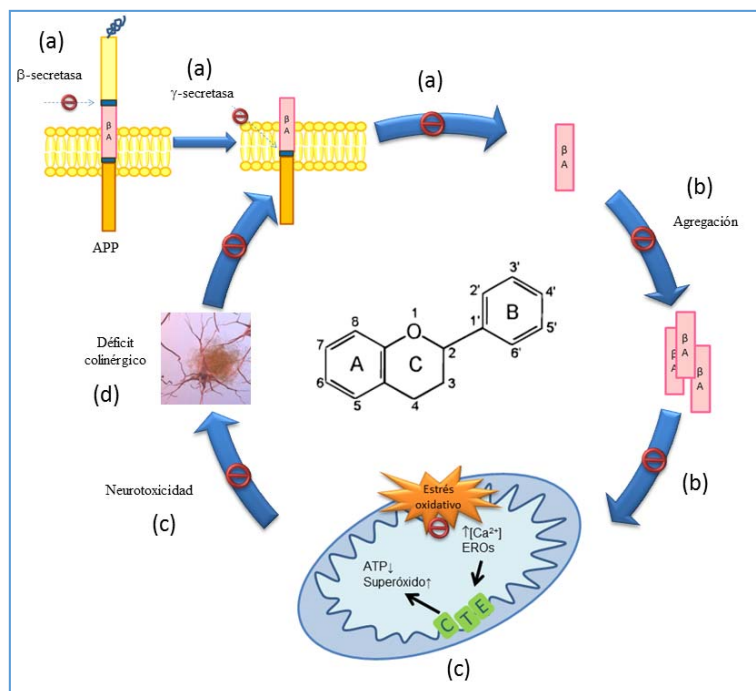


Figura 29. Dianas farmacológicas disponibles para el tratamiento de la EA en base a la teoría de la "cascada amiloide", que podrían modificar los flavonoides flavónicos en estudio.

El trabajo experimental que se llevó a cabo para la consecución de los objetivos descritos es el siguiente:

1. Evaluar el efecto de los flavonoides sobre la actividad de las enzimas β -secretasa, γ -secretasa y acetilcolinesterasa
2. Estudiar la inhibición de la agregación y el efecto desagregante de los flavonoides sobre el péptido βA_{25-35}
3. Cuantificar la inhibición de la generación de radicales libres inducido por H_2O_2
4. Determinar la toxicidad de los flavonoides

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. ACTIVIDAD β -SECRETASA

La BACE es la primera proteasa que participa en la vía amiloidogénica, de modo que su inhibición podría prevenir la formación de β A y como consecuencia, favorecer la vía no amiloidogénica. Diversos autores apuntan a la enzima BACE como una importante diana terapéutica para el tratamiento de la EA, ya que esta enzima inicia la producción del péptido β A y su inhibición no provoca mecanismos compensatorios, sino que disminuye principalmente la producción del β A (Sonker and Yadav, 2012; Wyss et al., 2011; Cai et al., 2001; Luo et al., 2001; Roberds et al., 2001).

El inconveniente principal en la búsqueda de nuevos inhibidores de BACE, es la dificultad que tienen de atravesar la barrera hematoencefálica. Se ha establecido que el tamaño máximo de estos flavonoides debe ser menor a 600 kDa. Los flavonoides de origen natural son moléculas de bajo peso molecular que tienen no más de 400 kDa, baja toxicidad, moderadamente lipófilas y además diversos estudios demuestran su capacidad de atravesar la BHE (Faria et al., 2010; Shimmyo et al., 2008b). Por tanto, son considerados potenciales candidatos como inhibidores de BACE.

Se realizó un screening inicial para evaluar el efecto de los flavonoides sobre la actividad BACE a una concentración de 100 μ M. De los seis flavonoides en estudio, quercetina y rutina inhibieron significativamente ($p < 0,05$) la actividad de BACE como se muestra en la Figura 30.

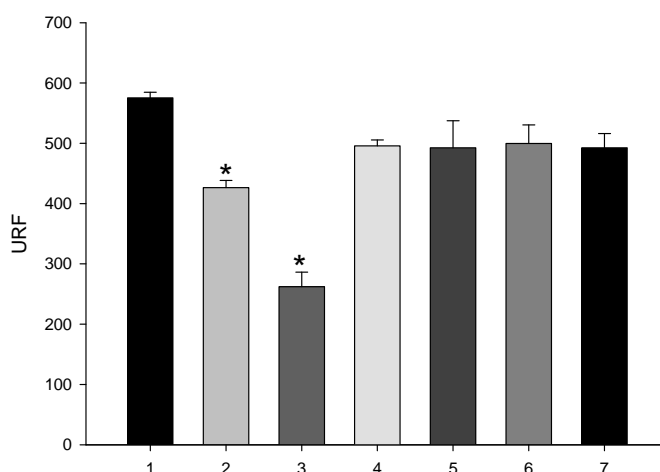


Figura 30. Actividad BACE en presencia de los flavonoides a 100 μ M 1. Reacción control, 2. Quercetina, 3. Rutina, 4. Troxerutina, 5. Diosmina, 6. Hidrosmína, 7. Naringina. * $p < 0,05$ vs. control (Test Student–Newman–Keuls).

Sin embargo, sólo rutina fue capaz de inhibir más del 50% la actividad enzimática de BACE. Por este motivo decidimos evaluar diferentes concentraciones de este compuesto, para corroborar dicha actividad. Tal y como se observa en la Figura 31, el efecto inhibitor que provocó rutina sobre la actividad BACE a las concentraciones en estudio, fue estadísticamente significativo y concentración-dependiente ($p < 0,05$), corroborando el efecto inhibitor de rutina sobre la actividad enzimática de BACE.

Shimmyo y col. (2008), reportaron mediante análisis de “docking” *in silico*, la capacidad de diversos flavonoides de interactuar con el centro activo de BACE mediante la formación de puentes de hidrógeno, (Shimmyo et al., 2008b) señalando que el flavonoide quercetina, tiene la capacidad de formar puentes de hidrógeno con los aminoácidos del centro activo Gln73, Asp228 y Trp198. En este trabajo también se indica que los grupos OH en las posiciones C3' y C4' favorece la unión de los flavonoides al centro catalítico de la enzima. En este sentido quercetina y rutina mostraron efecto inhibitor de BACE, mientras que troxerutina pierde el efecto inhibitor, probablemente porque los grupos hidroxilos en C3' y C4' están hidroxietilados.

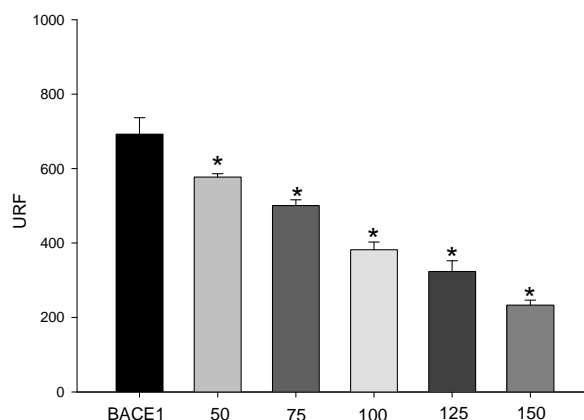


Figura 31. Actividad enzimática de BACE en presencia de rutina a diferentes concentraciones. * $p < 0,05$ vs. control (Test Student–Newman–Keuls).

Los mismos autores, también indican que la presencia de un OH en la posición C3, posiblemente interactúe con un residuo de Asp del centro activo, incrementando el efecto inhibitor. Por tanto, se esperaría que quercetina ejerciera mayor efecto inhibitor; no obstante, el derivado glucosídico rutina presenta mayor capacidad inhibitor de BACE, esto se podría correlacionar con la solubilidad de los flavonoides en fase acuosa y a $\text{pH}=4,5$. En el caso de rutina no presenta problemas de solubilidad en estas condiciones. Sin embargo, la lipofilia de quercetina dificulta su solubilidad. En nuestro estudio rutina mostró mejor actividad inhibitor de BACE ya que posiblemente la presencia de rutinosa en la posición 3 estabiliza la molécula favoreciendo su interacción con el centro activo. Hasta la fecha solo un fármaco, CTS-21166, ha llegado a la fase I de los ensayos clínicos (Ghosh et al., 2012). En este sentido compuestos de origen natural como los flavonoides constituyen una alternativa interesante para la búsqueda de inhibidores de BACE.

2.2. ACTIVIDAD γ SECRETASA

La segunda enzima encargada del procesamiento de APP, está formada por el complejo pentamérico γ -secretasa, la cual libera el péptido βA al medio extracelular. De ahí el interés por la búsqueda de flavonoides inhibidores de esta enzima, el inconveniente de esta ruta terapéutica, es que la enzima hidroliza otros sustratos biológicos que son importantes para la viabilidad celular; los flavonoides interesantes serían aquellos flavonoides que tuvieran la capacidad de inhibir exclusivamente la liberación del péptido βA .

De todos los flavonoides en estudio, sólo quercetina a la concentración de $100\ \mu\text{M}$ fue capaz de inhibir la actividad de γ -secretasa de forma moderada inhibiendo un 30,5% ($p < 0,001$). El compuesto L-685,458, utilizado como control positivo, fue capaz de inhibir la actividad enzimática en un 43,3% a la concentración de $1\ \mu\text{M}$ ($p < 0,001$). Los resultados se presentan en la Figura 32.

Mientras que quercetina muestra cierta actividad inhibitor de γ -secretasa, la glicosilación del grupo hidroxilo en la posición 3 que se da en el caso de rutina y troxerutina, anula completamente dicha actividad inhibitor, lo que hace pensar que el hidroxilo libre en esta posición podría contribuir al efecto inhibitor.

La γ -secretasa es parte esencial de la ruta de señalización de Notch, implicada en procesos de diferenciación celular (Kopan and Ilgan, 2009), por lo que el principal obstáculo es encontrar inhibidores que no interfieran con Notch para evitar los efectos tóxicos que supone su inhibición (Tong et al., 2013). El ensayo clínico mas reciente con un inhibidor de la γ -secretasa (semagacestat) completó con éxito la

fase II, pero se detuvo en la fase III cuando se observó un empeoramiento de los pacientes, al parecer por toxicidad en las sinapsis (<http://www.alzforum.org/>). Algunos fármacos, en concreto algunos antiinflamatorios no esteroideos, son capaces de modular la γ -secretasa y disminuir la producción de βA_{1-42} favoreciendo la producción de formas mas cortas. El primero de este tipo de fármacos en ensayo clínico fue tarenflurbil (R-flurbiprofeno), aunque no mostró efectos beneficiosos en fase III. En la actualidad, una amplia gama de flavonoides están en estudio como inhibidores selectivos de γ -secretasa (Wolfe, 2012).

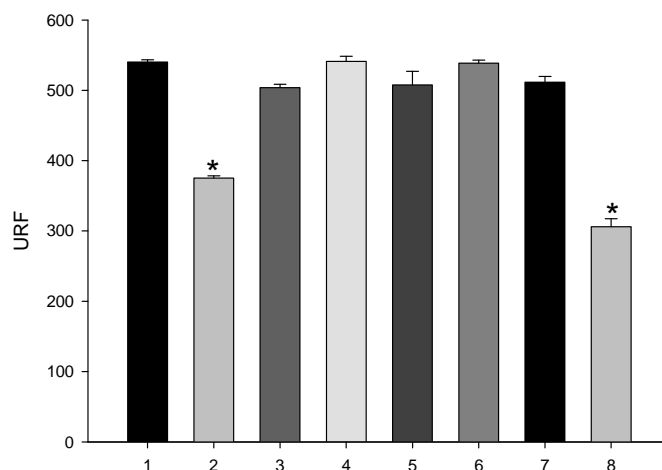


Figura 32. Actividad enzimática γ -secretasa en presencia de los flavonoides a 100 μM 1. Reacción control, 2. Quercetina, 3. Rutina, 4. Troxerutina, 5. Diosmina, 6. Hidroximetil, 7. Naringina, 8. L-685,458 1 μM . * $p < 0,001$ vs. control (Test Student–Newman–Keuls).

2.3. ACTIVIDAD ACETILCOLINESTERASA (AChE)

El déficit colinérgico está directamente asociado a la pérdida de memoria y se correlaciona con el grado de severidad de la EA (Giacobini, 1990). Una forma de restaurar la función colinérgica consiste en prolongar el tiempo de vida media de la ACh, inhibiendo la AChE, enzima encargada de hidrolizarla (Larner, 2011). El objetivo de estos fármacos es combatir el déficit colinérgico impidiendo la degradación de la ACh en el espacio sináptico. Entre los AChEI se encuentran la rivastigmina, donepezilo y galantamina, fármacos que se incluyen en los diferentes esquemas de tratamiento de la EA.

En general, el análisis de numerosas revisiones de la última década señala que estos fármacos tienen un efecto positivo en la función cognitiva, el comportamiento y las actividades de la vida diaria en pacientes con EA leve a moderada, mejorando su calidad de vida. En alguno de estos pacientes se encontró una mejora en las funciones cognitivas tras 1 ó 2 años de terapia (Martorana et al., 2010).

Se hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, más tolerables. Por este motivo decidimos incluir la búsqueda de AChEI en el screening inicial de trabajo, ya que en la bibliografía se atribuye esta propiedad a algunos polifenoles de naturaleza flavónica (Zhang et al., 2009; Tota et al., 2010; Liu et al., 2011). Se evaluó la influencia de los 6 flavonoides en estudio sobre la actividad AChE. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 33.

De todos los flavonoides testados, quercetina a la concentración de 100 μM mostró mayor efecto, con un porcentaje de inhibición del 30,8%; sin embargo, este resultado no es destacable en comparación a la inhibición del 66,4% que provocó galantamina a 10 μM . En el caso de los demás flavonoides también presentaron un ligero efecto inhibitor de la actividad de AChE de forma estadísticamente significativa; no obstante, el porcentaje de inhibición fue menor que en el caso de quercetina.

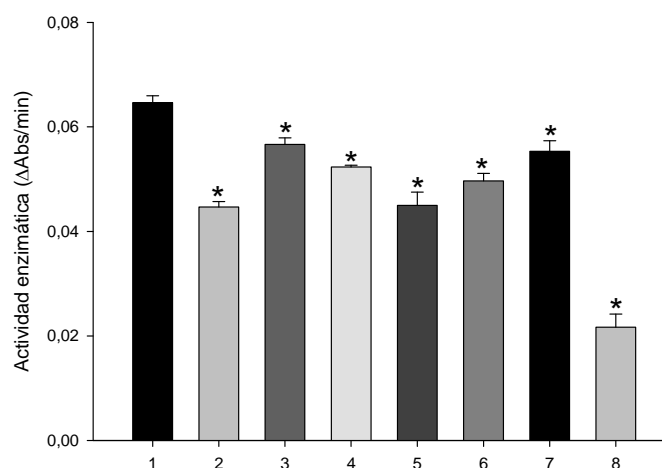


Figura 33. Actividad enzimática acetilcolinesterasa 0,42 U y en presencia de los flavonoides a 100 μM 1. Reacción control, 2. Quercetina, 3. Rutina, 4. Troxerutina, 5. Diosmina, 6. Hidroximetil, 7. Naringina, 8. Galantamina 10 μM. * $p < 0,05$ vs. control (Test Student–Newman–Keuls).

2.4. AGREGACIÓN DEL βA_{25-35}

La agregación del péptido βA constituye un paso importante en la patogénesis de la EA. Compuestos antiamiloidogénicos capaces de prevenir la agregación o desestabilizar los agregados una vez formados, podrían cobrar importancia en el tratamiento de esta enfermedad previniendo la neurotoxicidad que desencadenan estos agregados (Gauci et al., 2012; Ladiwala et al., 2011). En 1959 se describieron las fibras amiloides por primera vez gracias al uso de la ME. Estas fibras son el resultado final del proceso de agregación de las proteínas amiloides y su presencia se utiliza también como criterio para afirmar que una proteína está formando una estructura de este tipo.

El modelo vigente sostiene que cada fibra presenta un diámetro entre 75-80 Å y se encuentra formada por protofibras de 25-35 Å (Figura 34). En esta estructura la cadena peptídica forma hojas β cruzadas (paralelas o antiparalelas) que se disponen de forma perpendicular al eje fibrilar.

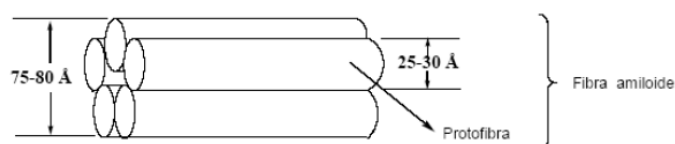


Figura 34. Modelo de una fibra amiloide

Los mecanismos moleculares relacionados con la formación de los agregados amiloides no han sido aún dilucidados, pero se acepta la existencia de un mecanismo general de formación. La fibrillogénesis es dependiente de un proceso de nucleación, ya que por diversos estudios se puso de manifiesto que generalmente presenta una cinética de tipo sigmoide (Figura 35). La proteína en estado monomérico establece un equilibrio lento con estructuras oligoméricas (tiempo de inducción), las cuales, una vez formadas, dan lugar rápidamente a fibras amiloides, ya sea mediante asociación de unidades de monómeros o bien por fusión de oligómeros. Además, el agregado de fibras preformadas provoca una disminución del tiempo de inducción.

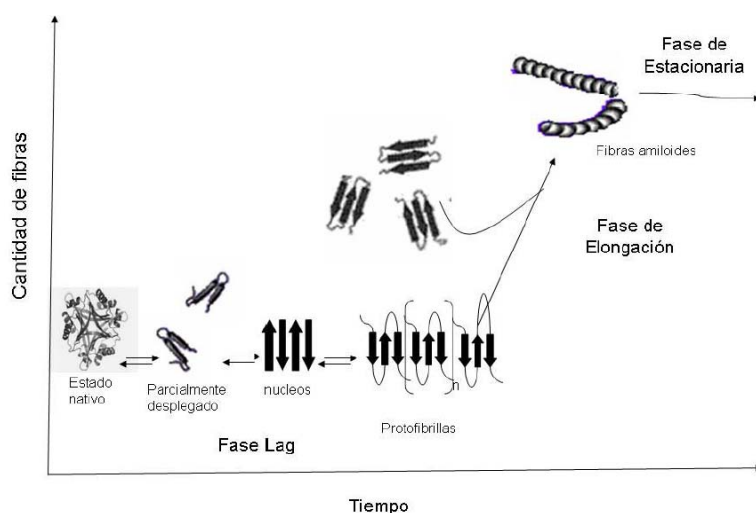


Figura 35. Cinética de formación de la fibra amiloide

La formación de fibras amiloides pueden también ser inducidas *in vitro* bajo condiciones fisicoquímicas adecuadas, permitiendo el estudio de los mecanismos que gobiernan el proceso. La inhibición o reversión de la formación de fibrillas amiloides constituye un posible mecanismo preventivo de las enfermedades amiloides como la EA y hasta la fecha, distintos flavonoides de bajo peso molecular han demostrado capacidad de inhibición del proceso *in vitro*.

Inhibición de la agregación por microscopía electrónica

Con el objetivo de reproducir la agregación del péptido βA *in vitro*, se utilizó el péptido βA_{25-35} , el cual conserva las propiedades de agregación y neurotoxicidad del péptido βA_{1-42} (Casley et al., 2002).

El péptido βA_{25-35} se disolvió en DMSO para garantizar la disolución de fibras preformadas hasta el estado monomérico. El péptido se preparó a una concentración final de 10 μM en PBS. A las 96 h de incubación, se observó la formación de fibrillas amorfas e irregulares, características de las placas seniles que se encuentran en los cortes histológicos cerebrales de pacientes con EA, tal y como se muestra en la Figura 36.

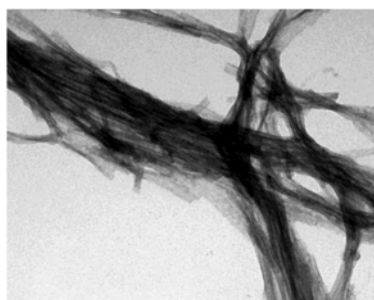


Figura 36. Formación de fibrillas del péptido βA_{25-25} después de 96 h de incubación

De los 6 flavonoides en estudio la coincubación de quercetina y rutina (10 μM) con el βA_{25-35} (Fig. 37 B y C, respectivamente) disminuyó drásticamente la formación de las fibrillas, evidenciando la capacidad inhibidora de ambos flavonoides sobre la agregación del péptido βA_{25-35} (Figura 36).

La ME nos permitió determinar en forma cualitativa el efecto inhibitorio de la agregación de quercetina y rutina sobre el péptido βA_{25-35} . Sin embargo, nos interesaba cuantificar dicho efecto por lo que se utilizó la técnica fluorimétrica de la tioflavina T.

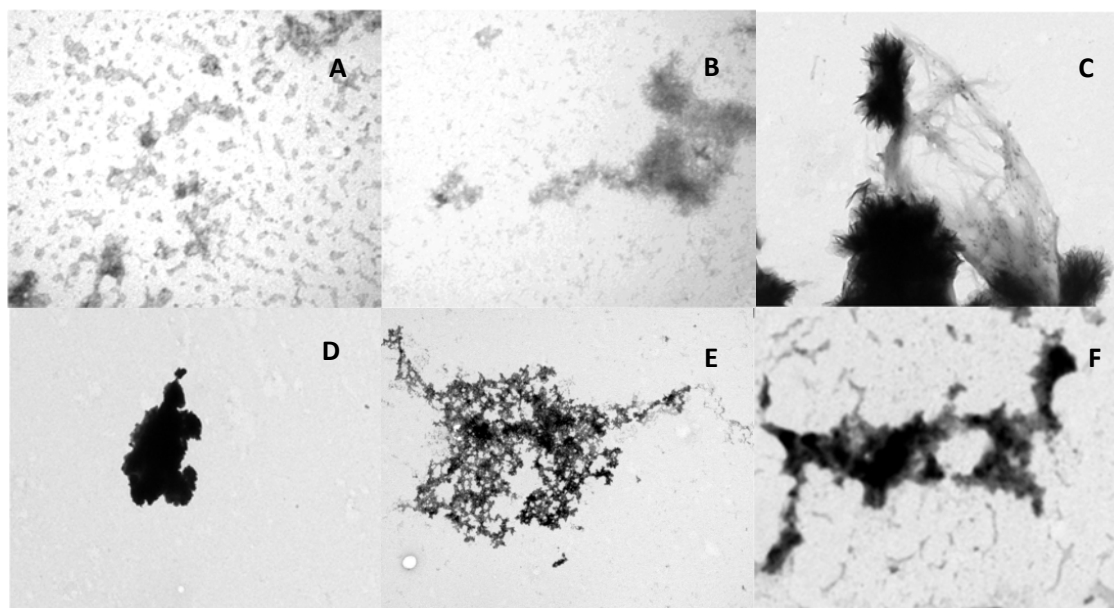


Figura 37. Inhibición de la agregación del péptido βA_{25-35} por microscopía electrónica. Formación de los filamentos de βA en presencia de los flavonoides a la concentración de $10 \mu M$ (A) Quercetina (B) Rutina (C) Troxerutina (D) Diosmina (E) Hidrosmína (F) Naringina. Escala $200 \eta m$.

Cuantificación de la agregación por espectroscopia de fluorescencia estacionaria

La estructura de la ThioT se representa en la Figura 38. La unión de ThioT a las fibras de amiloide, potencia su fluorescencia intrínseca, la cual pasa de tener un pequeño máximo de excitación a $415 \eta m$ a tener un máximo mucho más intenso a $450 \eta m$. La variación en el espectro de excitación va acompañada de la aparición de un máximo de emisión a $482 \eta m$.

La fluorescencia de la ThioT_{libre} es despreciable frente a la ThioT_{unida}, por ello la cuantificación de la fluorescencia se realizó directamente a $\lambda_{exc}=450 \eta m$; $\lambda_{em}=482$, utilizando como blanco ThioT en PBS.

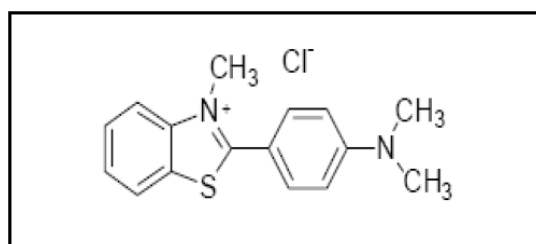


Figura 38. Estructura química de la tioflavina T

Se siguió el mismo método descrito para cuantificar la inhibición de la agregación del βA_{25-35} por ME. El péptido se preparó a una concentración final de $10 \mu M$ en PBS, el cual se utilizó como control de agregación. Por otro lado, para evaluar el efecto inhibitor de los flavonoides, éstos se añadieron al mismo tiempo que el βA_{25-35} . Tras 96 h de incubación, se determinó la fluorescencia.

De todos los flavonoides en estudio, los que presentaron mejor capacidad de inhibir la agregación del βA fueron quercetina y rutina con un porcentaje de inhibición del 85,4 y del 70,7% respectivamente (Figura 39), estos resultados corroboran los obtenidos por ME.

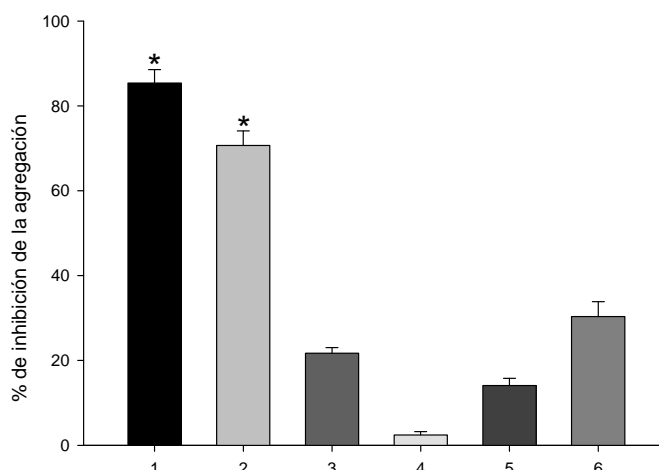


Figura 39. Porcentaje de inhibición de la agregación del péptido βA_{25-35} . 1. Quercetina, 2. Rutina, 3. Troxeutina, 4. Diosmina, 5. Hidrosmína, 6. Naringina. * $p < 0,05$ vs. control (Test Student–Newman–Keuls).

A la vista de los resultados obtenidos, decidimos profundizar en el estudio del efecto inhibidor de la agregación del péptido βA_{25-35} provocado por quercetina y rutina, para lo cual evaluamos las concentraciones de 1, 5 y 10 μM . Ambos flavonoides inhibieron de forma significativa ($p < 0,05$) la agregación del péptido. En la Figura 40 se presenta el porcentaje de inhibición de quercetina y rutina para las tres concentraciones en estudio, respectivamente.

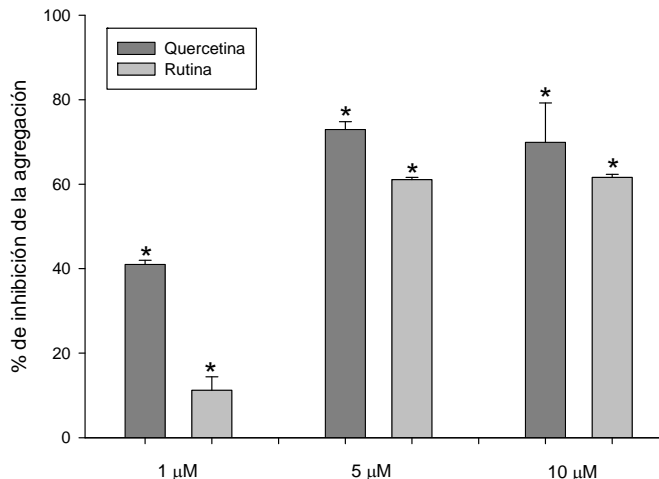


Figura 40. Porcentaje de Inhibición de la agregación del βA_{25-35} por quercetina y rutina. * $p < 0,001$ vs. control (Test Student–Newman–Keuls)

Cabe destacar que entre las concentraciones de 1 y 5 μM tanto para quercetina como para rutina, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$), mientras que entre las concentraciones de 5 y 10 μM , no se observaron, ya que la concentración de 10 μM provocó un efecto inhibitor de la agregación similar al que se alcanzó con la concentración de 5 μM . Quercetina por su parte, provocó un efecto inhibitor importante a la concentración de 1 μM , siendo el porcentaje de inhibición de 40,9%. De estos resultados podemos concluir que quercetina ejerce un mayor efecto inhibitorio sobre la agregación del péptido βA_{25-35} con respecto a rutina.

Tras demostrar el efecto inhibidor de quercetina y rutina, se determinó la capacidad desagregante de los flavonoides frente a la agregación del péptido βA_{25-25} . Este ensayo requiere la agregación previa del péptido durante 96 h. Transcurrido el tiempo se adicionaron los flavonoides y la mezcla se incubó 72 h adicionales en agitación constante. Solamente quercetina y rutina fueron capaces de desagregar las fibrillas previamente formadas. Siendo los porcentajes de inhibición de 76,24 y 65,7% para quercetina y rutina, respectivamente ($p < 0,001$) (Figura 41).

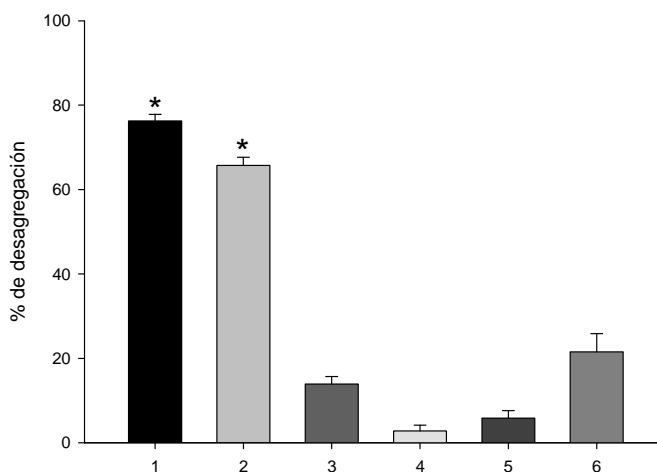


Figura 41. Porcentaje de desagregación del péptido βA_{25-35} . 1. Quercetina, 2. Rutina. 3. Troxeutina 4. Diosmina, 5. Hidrosmia, 6. Naringina. * $p < 0,001$ vs. control (Test Student–Newman–Keuls).

De la misma forma que se procedió en el caso de la evaluación del efecto inhibidor de los flavonoides más activos, también en este caso se decidió evaluar las concentraciones de 1, 5 y 10 μM de ambos flavonoides, para determinar el comportamiento del efecto desagregante que provocaron quercetina y rutina.

Ambos flavonoides desagregaron de forma significativa ($p < 0,05$) y concentración dependiente, el βA_{25-35} agregado previamente durante 96 horas en condiciones fisiológicas. Los resultados se expresan en porcentaje de desagregación y se presentan en la Figura 42, para quercetina y rutina.

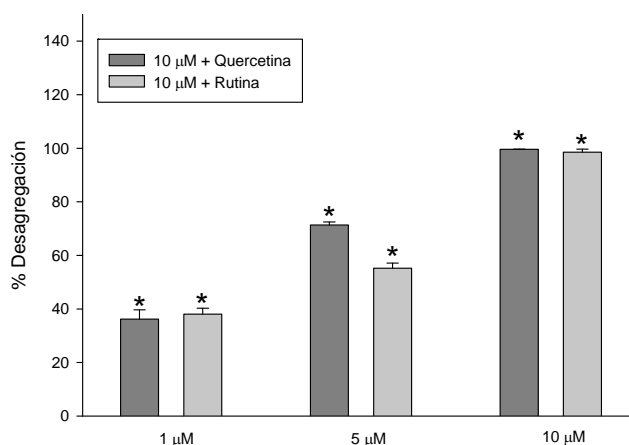


Figura 42. Porcentaje de desagregación del péptido βA_{25-35} por quercetina y rutina. * $p < 0,05$ vs. control (Test Student–Newman–Keuls)

Cabe resaltar que el efecto desagregante que ejercieron tanto quercetina y rutina fue similar a todas las concentraciones ensayadas. A la concentración más alta ambos flavonoides desagregaron casi

completamente las fibrillas previamente formadas. Estos resultados evidencian que ambos flavonoides presentan mayor efecto desagregante que inhibidor de la agregación a la concentración de 10 μM .

Cuantificación de la agregación por espectroscopia de fluorescencia de fase resuelta

El inconveniente de la espectroscopia de fluorescencia estacionaria es que los valores que se obtienen son absolutos (la intensidad depende de parámetros experimentales tales como la intensidad de excitación, la apertura de los monocromadores, etc.), por lo que siempre se comparan los resultados con una preparación de referencia en este caso el péptido βA agregado. Además, pueden existir interferencias si los compuestos en estudio absorben a la misma longitud de excitación o de emisión, dando resultados falso-positivos.

Para descartar cualquier sesgo en el resultado final, se decidió utilizar la determinación de la fluorescencia de fase resuelta para confirmar el efecto inhibidor y desagregante de quercetina y rutina sobre el péptido βA_{25-35} . Ésta técnica aporta más información, ya que permite obtener la vida media de fluorescencia de los fluoróforos. Una de las características más importantes de un fluoróforo es el tiempo promedio que permanece en el estado excitado antes de su retorno al estado fundamental. Por tanto, determina el tiempo disponible para que el fluoróforo interactúe con el ambiente (difunda, rote, se quenchee) brindando de este modo información de su emisión.

Para este ensayo se utilizaron las mismas condiciones de cuantificación seguidas en el caso de la determinación de la fluorescencia en fase estacionaria; los flavonoides se testaron a las concentraciones de 1, 5 y 10 μM y el péptido βA_{25-35} a 10 μM . Los resultados se muestran en forma de histogramas que representan la fluorescencia producida por la formación del complejo ThioT- βA durante la emisión. En la Figura 43 (A y B) se pueden observar los histogramas obtenidos para la inhibición de la agregación producidos por quercetina y rutina respectivamente.

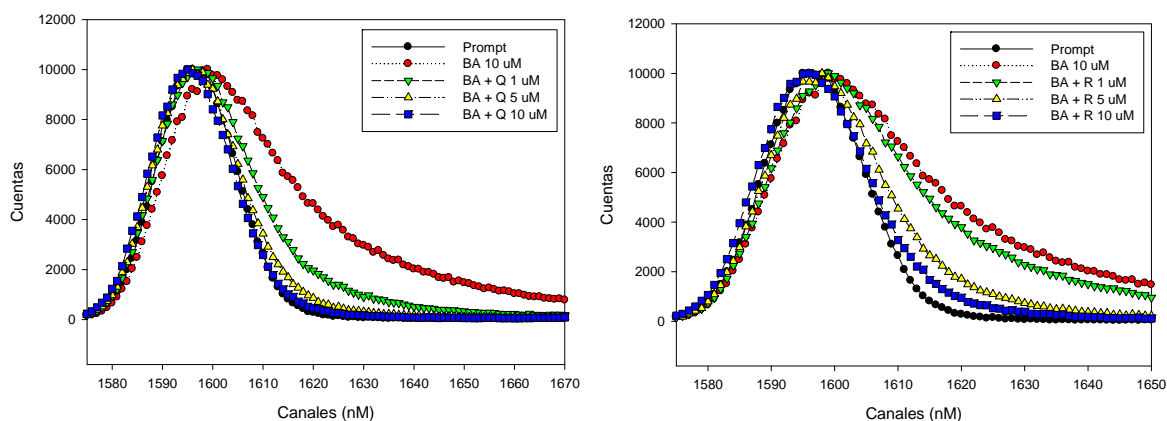


Figura 43. Inhibición de la agregación del péptido βA_{25-35} inducido por quercetina (A) y rutina (B) a las concentraciones de 1, 5 y 10 μM , cuantificada por espectroscopia de fluorescencia en fase resuelta

El prompt representa el ruido basal del laser (color negro), el histograma descrito por el βA (color rojo), se diferencia visiblemente del ruido basal del laser, indicando la formación del complejo ThioT- βA , con un tiempo de vida media de $1,707 \pm 0,02851$ ns a los 4 días de agregación. En la Figura 43 A se representan los histogramas descritos por quercetina a las concentraciones de 1 (color verde), 5 (color amarillo) y 10 μM (color azul) en presencia del βA_{25-35} a 10 μM , siendo el tiempo de vida media en cada caso $1,007 \pm 0,0167$; $0,461 \pm 0,0277$ y $0,518 \pm 0,165$ ns, representando en porcentaje de inhibición de agregación el 41, 73 y 70%, respectivamente. El efecto fue estadísticamente significativo ($p < 0,001$) para todas las concentraciones ensayadas y concentración dependiente entre las concentraciones de 1 y 10 μM ($p < 0,05$).

Los resultados observados para la inhibición de la agregación de rutina se representan en la Figura 47 B. Rutina también mostró un efecto inhibitor de la agregación del péptido βA_{25-35} a las concentraciones de 1, 5 y 10 μM . El tiempo de vida media en cada caso fue de $1,513 \pm 0,0285$; $0,664 \pm 0,0047$; $0,655 \pm 0,0156$ ns, siendo los porcentaje de inhibición de 11, 61, 62% respectivamente. El efecto observado fue estadísticamente significativo entre las concentraciones de 5 y 10 μM ($p < 0,001$), y entre las concentraciones de 1 y 10 μM ($p < 0,05$).

El efecto inhibitor máximo se alcanzó a la concentración de 5 μM para quercetina y rutina, el incremento de la concentración de los flavonoides a 10 μM no se tradujo en un incremento de la inhibición de la formación de fibrillas de βA_{25-35} . El efecto inhibitor que provocó quercetina fue ligeramente superior con respecto a rutina, evidenciándose mejor a la concentración de 1 μM , ya que quercetina inhibió el 41% de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$), por el contrario rutina solo provocó un 11% de inhibición y este efecto no fue estadísticamente significativo.

Tras confirmar el efecto inhibitor de quercetina y rutina, se procedió a evaluar el efecto desagregante de los mismos sobre el βA_{25-35} previamente agregado, mediante la técnica de espectroscopia de fluorescencia en fase resuelta. Los histogramas obtenidos se presentan en las Figuras 44 (A y B) para quercetina y rutina respectivamente. En este caso el tiempo de vida media para el complejo ThioT- βA a las 7 días de agregación fue de $1,573 \pm 0,0623$ ns, evidenciando una ligera disminución de aproximadamente el 7,85% con respecto al tiempo de vida media determinado a los 4 días de agregación.

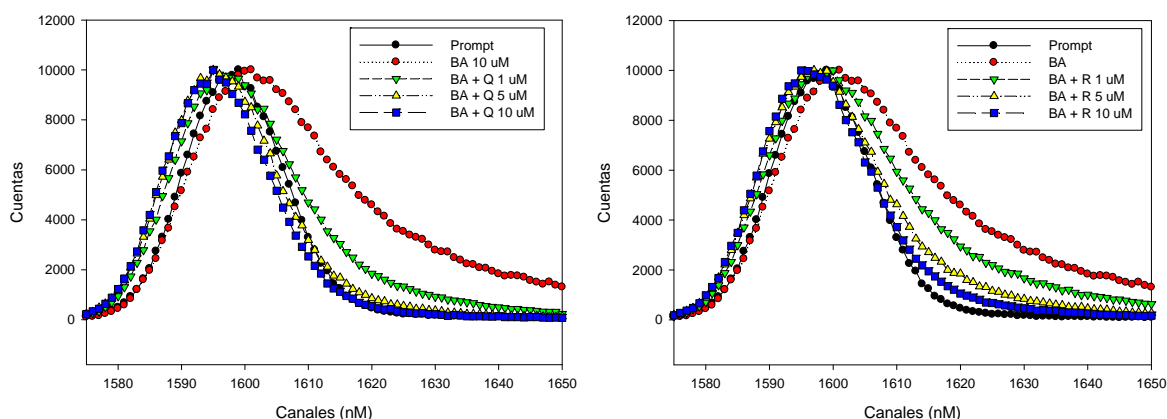


Figura 44. Desagregación del péptido βA_{25-35} inducido por quercetina (A) y rutina (B) a las concentraciones de 1, 5 y 10 μM , cuantificada por espectroscopia de fluorescencia en fase resuelta.

En la Figura 44 se representa los histogramas correspondientes al efecto desagregante provocado por quercetina (A). En este caso, la exposición de las fibrillas de βA_{25-25} previamente formadas a cada una de las concentraciones quercetina, provocó un efecto desagregante estadísticamente significativo ($p < 0,001$) y concentración-dependiente ($p < 0,05$). El tiempo de vida media del complejo βA -ThioT en presencia de quercetina 1, 5 y 10 μM fue de $1 \pm 0,0265$; $0,427 \pm 0,0145$; $0,006 \pm 0,0004$ ns, desagregando en cada caso el 36, 73 y 100%, respectivamente.

Al igual que quercetina, rutina (Figura 44 B) desagregó de forma significativa y concentración dependiente las fibrillas del péptido βA_{25-35} previamente agregadas. Los tiempos de vida del complejo fluorescente βA -ThioT en presencia de rutina fueron $0,941 \pm 0,0112$; $0,702 \pm 0,0068$ y $0,0232 \pm 0,0174$ ns para las concentraciones de 1, 5 y 10 μM respectivamente.

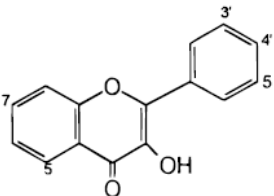
Quercetina mostró un porcentaje de desagregación mayor (18%) con respecto a rutina a la concentración de 5 μM . A las otras concentraciones en estudio el efecto fue similar; a la concentración de 1 μM , ambos flavonoides desagregaron más del 36% las fibrillas preformadas del péptido en estudio.

El efecto máximo para ambos flavonoides, se alcanzó a la concentración de 10 μ M llegando a desagregar alrededor del 100% las fibrillas previamente formadas. Estos resultados evidencian que ambos flavonoides ejercen un efecto desagregante ligeramente superior con respecto a la actividad inhibidora del péptido β A₂₅₋₃₅.

La determinación del tiempo de vida media del fluoróforo β A-ThioT en presencia de nuestros flavonoides más activos, nos permitió corroborar el efecto inhibidor y desagregante de quercetina y rutina sobre el péptido β A₂₅₋₃₅, además se observó que los resultados obtenidos por espectroscopia de fluorescencia estacionaria fueron similares a los obtenidos por fluorescencia en fase resuelta, evidenciando que en el caso de los flavonoides en estudio no existe interferencias y que ambas técnicas son válidas para evaluar el efecto inhibidor y desagregante del péptido β A₂₅₋₃₅.

De los tres grupos de flavonoides estudiados, los más interesantes fueron el grupo de los flavonoles (Tabla 22), siendo los más activos quercetina y rutina. Quercetina y rutina se caracterizan por la presencia de un grupo catecol (hidroxilos en las posiciones 3' y 4') en el anillo B, probablemente este grupo funcional sea primordial para el efecto inhibidor y desagregante del péptido β A. En el caso de las flavonas como diosmina e hidrosmina y de la flavanona naringina, el hidroxilo en la posición 4' del anillo B se encuentra metilado, lo cual explicaría la pérdida de la actividad inhibidora y desagregante del péptido β A. En el caso de troxerutina un derivado de rutina que posee el grupo catecol dihidroxietilado, tampoco se observó ningún efecto sobre la agregación del péptido β A, evidenciando la importancia de los grupos hidroxilos en las posiciones 3' y 4' para el efecto antimailoidogénico de los flavonoides.

Tabla 22. Estructura química de los flavonoles en estudio



Compuesto	C3'	C4'	3	5	7	C2-C3
Quercetina	OH	OH	OH	OH	OH	Doble
Rutina	OH	OH	Rutinosa	OH	OH	Doble
Troxerutina	OCH ₂ CH ₂ OH	OCH ₂ CH ₂ OH	Rutinosa	OH	OCH ₂ CH ₂ OH	Doble

Otros autores han resaltado la importancia de los grupos hidroxilo en el anillo B de los flavonoides, destacando que el aumento en el número de grupos hidroxilo en el anillo B potencia el efecto inhibidor de los flavonoides. Por ejemplo observaron que la actividad inhibidora de miricetina es superior con respecto a otros flavonoides estudiados, posiblemente debido a la presencia de un grupo hidroxilo adicional en la posición 5' del anillo B (Akaishi et al., 2008).

En el proceso de inhibición de la agregación, se produce una interacción hidrofóbica entre los anillos aromáticos del flavonoide y las estructuras β , desestabilizándolas e impidiendo el proceso de fibrillogénesis. Los grupos hidroxilo de los anillos aromáticos actuarían como electrodonadores interrumpiendo la formación de puentes de hidrógeno (Honson et al., 2007; Convertino et al., 2009; Yang et al., 2010a, 2010b).

Del mismo modo, diversos estudios apoyan esta hipótesis, resaltando la importancia del número de grupos hidroxilo, no solo en el anillo B, sino en toda la estructura, indicando que a mayor número de grupos hidroxilo se incrementa la actividad antiamiloidogénica. El ácido tánico, polímero del ácido gálico y cuya estructura forma parte de la miricetina, ha mostrado capacidad de inhibir la formación de

agregados de βA y desestabilizar las fibrillas preformadas *in vitro* (Ono et al., 2004). La propiedad antiamiloidogénica del ácido tánico es mayor que la que poseen los polifenoles del vino, lo cual podría estar relacionado con el mayor número de grupos hidroxilo que contiene la molécula. Sin embargo, la desventaja que presenta es su gran tamaño, lo que dificulta su paso a través de la BHE.

2.5. VIABILIDAD CELULAR

Antes de profundizar en el estudio de estos flavonoides, decidimos evaluar previamente la toxicidad de rutina y quercetina en nuestro modelo experimental. Las células APPswe se trataron con los flavonoides en estudio durante 24 h a las concentraciones de 25, 50 y 100 ηM , determinándose en los sobrenadantes la actividad LDH que utilizamos como marcador de muerte celular. Los resultados se representan como porcentaje de LDH liberada al medio, siendo el 100%, la actividad de LDH liberada al medio de las células APPswe sin tratamiento (Tabla 23).

Cuando la célula muere por necrosis pierde la permeabilidad de la membrana, lo que favorece la liberación de LDH al medio, permitiéndose su detección fluorimétrica en el sobrenadante celular. La cuantificación de dicha actividad enzimática evidenció que los tratamientos con quercetina y rutina fueron capaces de inhibir la muerte por necrosis de forma estadísticamente significativa.

Tabla 23. Medida de la viabilidad celular (MTT) y muerte celular (LDH)

		% de LDH liberada al medio	Viabilidad celular (MTT)
APPswe	Control	100	0,608 \pm 0,0078
	Quercetina 25 ηM	99,117 \pm 0,144	0,630 \pm 0,0095
	50 ηM	74,250 \pm 1,009*	0,640 \pm 0,0105
	100 ηM	82,042 \pm 1,154*	0,665 \pm 0,0161*
	Rutina 25 ηM	80,269 \pm 4,042*	0,656 \pm 0,016*
	50 ηM	85,027 \pm 0,626*	0,692 \pm 0,062*
	100 ηM	86,577 \pm 1,421*	0,704 \pm 0,0128*

* $p < 0,001$ frente a APPswe control. (Test Student-Newman-Keuls).

Quercetina a las concentraciones más altas de 50 y 100 ηM inhibió la liberación de LDH en un 25,8 y 18% respectivamente ($p < 0,001$). Del mismo modo, el tratamiento con rutina inhibió de forma significativa la muerte celular a las tres concentraciones ensayadas ($p < 0,001$). Los porcentajes de inhibición fueron 19,7; 15 y 13,4% para 25, 50 y 100 ηM , respectivamente.

También, evaluamos el efecto de los tratamientos de quercetina y rutina en las células APPswe, sobre la viabilidad celular mediante la técnica espectrofotométrica del MTT, los resultados se presentan en la Tabla 23, como valores de absorbancia. Los tratamientos efectuados no mostraron ningún efecto tóxico en comparación a las células APPswe control.

Los ensayos de LDH y MTT son ensayos preliminares que se realizan para seleccionar concentraciones de flavonoides que no produzcan muerte celular. De los resultados obtenidos podemos concluir que las concentraciones de 25, 50 y 100 ηM , de quercetina y rutina, no generan toxicidad a las 24 h de tratamiento.

2.6. GENERACIÓN DE RADICALES LIBRES INDUCIDA POR PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Se ha descrito que la actividad antiamiloidogénica de los flavonoides está directamente relacionada con la actividad antioxidante (Howes et al., 2003). En esta fase del trabajo decidimos corroborar esta afirmación evaluando la actividad antioxidante de los flavonoides en estudio en la línea celular transgénica APPswe. En éste modelo celular según la teoría de la cascada amiloide, probablemente se favorece el procesamiento de la APP, lo que a su vez provoca un incremento de la producción del péptido

β A, el cual se ha propuesto que actúa como una metaloenzima, capaz de generar radicales libres por unión a los iones Fe^{3+} y Cu^{2+} mediante los residuos de histidina que presenta su secuencia (Atwood et al., 2000; Opazo et al., 2002; Castellani et al., 2004). Esta interacción provoca la reducción de los iones, con formación de H_2O_2 como subproducto. Este compuesto es altamente reactivo y difunde a través de la membrana siendo capaz de oxidar perjudicialmente lípidos y proteínas intracelulares.

Con objeto de reproducir de forma aguda este evento, se indujo la liberación de radicales libres por adición a las células de H_2O_2 a $100\ \mu\text{M}$ durante 60 min. Este ensayo nos permitió evaluar la capacidad antioxidante de los flavonoides en estudio en la línea celular transgénica APPswe. Los flavonoides a la concentración de $10\ \mu\text{M}$ fueron añadidos 30 min, previa a la adición del tóxico para poder determinar la capacidad captadora de radicales libres de los mismos.

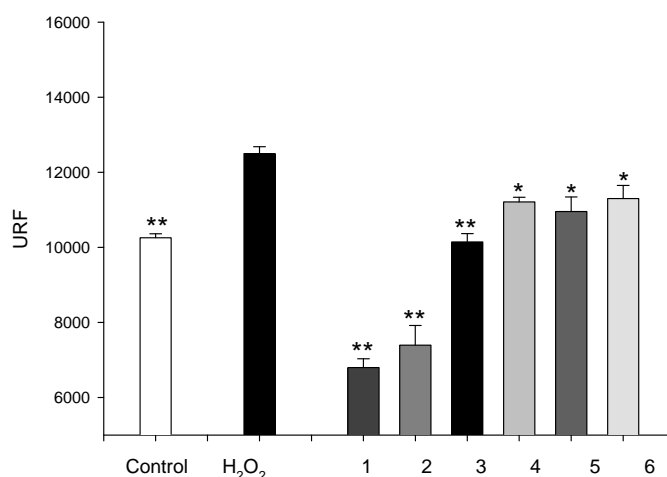


Figura 45. Generación de radicales libres inducida por H_2O_2 $100\ \mu\text{M}$ y en presencia de los flavonoides a $10\ \mu\text{M}$ 1. Quercetina, 2. Rutina, 3. Trolox, 4. Diosmina, 5. Hidrosmína, 6. Naringina. ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ frente al tratamiento con H_2O_2 . (Test Student-Newman-Keuls).

En la Figura 45 se representan los resultados obtenidos en URF. Podemos observar que la adición del H_2O_2 a $100\ \mu\text{M}$, incrementó la liberación de radicales libres en un 22% con respecto a las células control. En mayor o menor grado todos los flavonoides fueron capaces de inhibir la liberación de radicales libres, de forma estadísticamente significativa, siendo los flavonoides más activos quercetina y rutina. Ambos flavonoides inhibieron la liberación de radicales libres por debajo de las células control en un 33,7 y 27,9% respectivamente. Estos resultados podrían evidenciar cierto grado de toxicidad de los flavonoides a la concentración de $10\ \mu\text{M}$, ya que las células para mantener la viabilidad celular requieren unos niveles fisiológicos de radicales libres para hacer posible la respiración mitocondrial.

A la vista de estos resultados, fue necesario evaluar un amplio rango de concentraciones de quercetina y rutina ($0,01$ - $10\ \mu\text{M}$), para poder seleccionar solo aquellas concentraciones capaces de inhibir exclusivamente la liberación de radicales libres inducida por el H_2O_2 . En la Figura 46 se presentan los resultados obtenidos.

Los niveles de radicales libres inducidos exclusivamente por el tóxico empleado, representa el 32,7% con respecto a las células control. Podemos observar que a partir de $1\ \mu\text{M}$, ambos flavonoides favorecieron la captación de radicales libres por debajo de las células control. Mientras que entre las concentraciones de $0,01$ - $0,1\ \mu\text{M}$, fueron capaces de inhibir la liberación de radicales libres exclusivamente inducida por el H_2O_2 a $100\ \mu\text{M}$, de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$), seleccionando este rango de concentraciones para los experimentos posteriores. Estos resultados podrían explicar el fenómeno de "*hormesis*" descrito para los flavonoides, este efecto explica que este

tipo de compuestos a concentraciones altas $>10 \mu\text{M}$, actúan como citotóxicos, mientras que a concentraciones bajas poseen efecto beneficiosos para la célula (Vargas and Burd, 2010; Mattson, 2008).

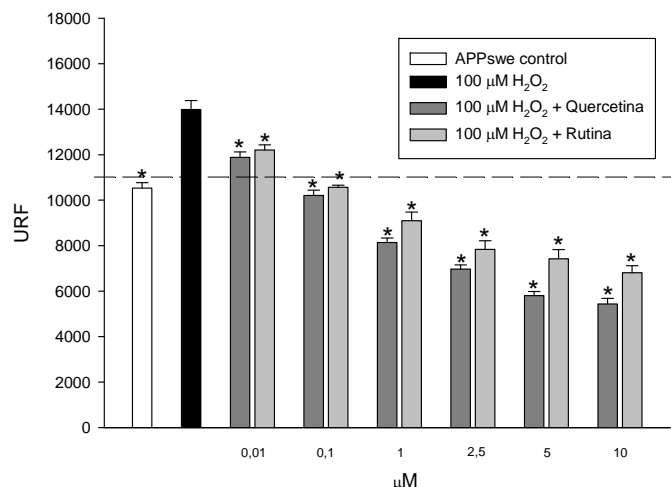


Figura 46. Generación de radicales libres inducida por H₂O₂ 100 μM y en presencia de diferentes concentraciones de quercetina y rutina. * $p < 0,001$ frente al tratamiento con H₂O₂ 100 μM . (Test Student-Newman-Keuls).

Después de determinar el rango de concentraciones de quercetina y rutina (0,01-0,1 μM) capaz de revertir la liberación de radicales libres inducida por el H₂O₂, se seleccionaron las concentraciones de 25, 50 y 100 ηM de cada flavonoide. En la Figura 47 se observa que tras la exposición de las células al H₂O₂ a 100 μM se incrementó la liberación de radicales en un 24,43% ($p < 0,001$) con respecto a las células control. El pretratamiento con los flavonoides a las concentraciones de 25, 50 y 100 ηM , inhibieron la liberación de radicales libres para quercetina (68, 91 y 100%) y rutina (42, 70 y 90%), respectivamente, de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$). El comportamiento fue concentración dependiente para ambos flavonoides entre las concentraciones de 25 y 100 ηM ($p < 0,05$).

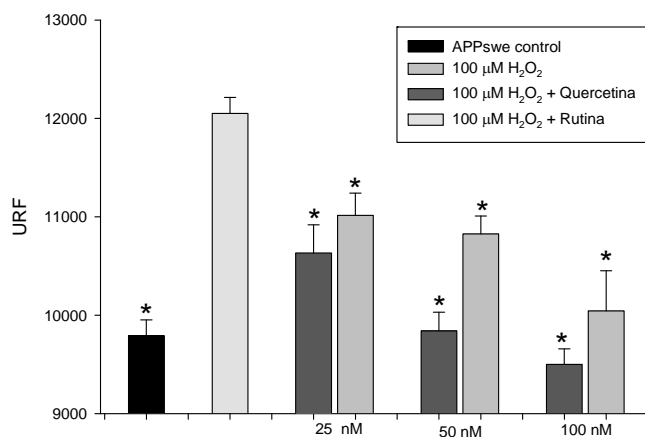


Figura 47. Generación de radicales libres inducida por H₂O₂ 100 μM y en presencia de diferentes concentraciones de quercetina y rutina. * $p < 0,05$ frente al tratamiento con H₂O₂ 100 μM . (Test Student-Newman-Keuls).

En relación a la estructura-actividad antioxidante, diversos autores coinciden en considerar como grupos funcionales fundamentales:

- La presencia del grupo catecol en el anillo B, al ser un buen electrodonador, reacciona fácilmente con cualquier especie radicalaria
- El grupo carbonilo en posición 4 en conjugación con el doble enlace entre los carbonos 2 y 3, son responsables de la deslocalización electrónica

- c) Un OH libre en la posición 3 del anillo heterocíclico también incrementa la capacidad captadora de radicales libres
- d) Los OH libres en las posiciones 5 y 7 puede aumentar la actividad antioxidante por incremento de la deslocalización electrónica, aunque la presencia de estos no es tan determinante como los anteriores

Como se puede apreciar, tanto quercetina como rutina están provistos de los requerimientos estructurales antes mencionados, a excepción de rutina, que carece del grupo OH libre en la posición 3, ya que se encuentra glicosilado por el disacárido rutinosa. Este hecho podría explicar la disminución del efecto antioxidante de rutina con respecto a quercetina.

Otros estudios *in vitro* muestran que la quercetina, protege a bacterias y células de mamíferos frente a la toxicidad inducida por el H₂O₂, donde el α -tocoferol no es efectivo (Ishige et al., 2001; Patil et al., 2003). Incluso existen evidencias de que este compuesto presenta mayor capacidad neuroprotectora que la vitamina C (Heo and Lee, 2004).

3. CONCLUSIONES DEL ESTUDIO *IN VITRO*

En los ensayos de actividad antiamiloidogénica *in vitro* con los seis flavonoides estudiados:

1. Rutina fue capaz de inhibir la actividad enzimática β -secretasa de forma concentración-dependiente, lo que supondría una inhibición en la formación del β -amiloide. El grupo catecol en el anillo B podría promover la unión del compuesto al centro activo del enzima y la rutinosa, en la posición 3, estabilizar dicha unión.
2. Quercetina mostró una ligera capacidad inhibidora del complejo pentamérico γ -secretasa. El grupo hidroxilo en la posición 3 probablemente contribuya al efecto inhibidor del complejo enzimático puesto que la glicosilación en esta posición anula completamente el efecto.
3. Tanto quercetina como rutina presentaron una relevante capacidad inhibidora de la agregación *in vitro* de la amiloidogénesis, así como un importante efecto desagregante de las fibrillas previamente formadas. El grupo catecol en el anillo B de ambos flavonoles podría interrumpir la formación de los puentes de hidrógeno que configuran la estructura estable de las láminas β plegadas del agregado.
4. La inhibición de BACE y del complejo pentamérico γ -secretasa así como la importante capacidad inhibidora de la agregación *in vitro* y el efecto desagregante de las fibrillas previamente formadas, hace de quercetina y rutina buenos candidatos para profundizar en su estudio de actividad en modelos celulares y animales.

“Estudio de las propiedades
neuroprotectoras de
quercetina y rutina en la línea
celular transgénica APPswe”

1. OBJETIVOS DEL ESTUDIO EN LA LÍNEA CELULAR TRANSGÉNICA APP_{swe}

En los experimentos *in vitro* se evidenció el buen perfil antiamiloidogénico y antioxidante que poseen quercetina y rutina. En esta fase del proyecto, nos planteamos profundizar en el estudio de ambos compuestos, a nivel celular. El modelo que se escogió fue la línea estable de neuroblastoma humano SH-SY5Y, transfectada con el gen APP^{swe} que contiene la mutación sueca (APP^{swe}; K670M/N671L), a la cual denominaremos en adelante APP^{swe}. Esta mutación en humanos se transmite con un patrón de herencia mendeliana autosómico dominante y la aparición de la enfermedad se da de forma precoz, generalmente antes de los 60 años de edad.

La mutación APP^{swe} K670M/N671L provoca una alteración en el procesamiento de APP con respecto a la producción del péptido β A (Haass et al., 1994; Suzuki et al., 1994), favoreciendo la proteólisis por la enzima BACE generando un incremento entre 3-6 veces de la producción del péptido β A₁₋₄₀ y β A₁₋₄₂ (Citron et al., 1992; Cai et al., 1993).

Se pretende determinar el posible efecto antiamiloidogénico y antioxidante que poseen quercetina y rutina sobre la línea transgénica APP^{swe}, con el fin de aportar nuevas moléculas potencialmente activas en el tratamiento de la EA. En la Figura 48, se representan las diferentes dianas terapéuticas, en base a la teoría de la cascada amiloide:

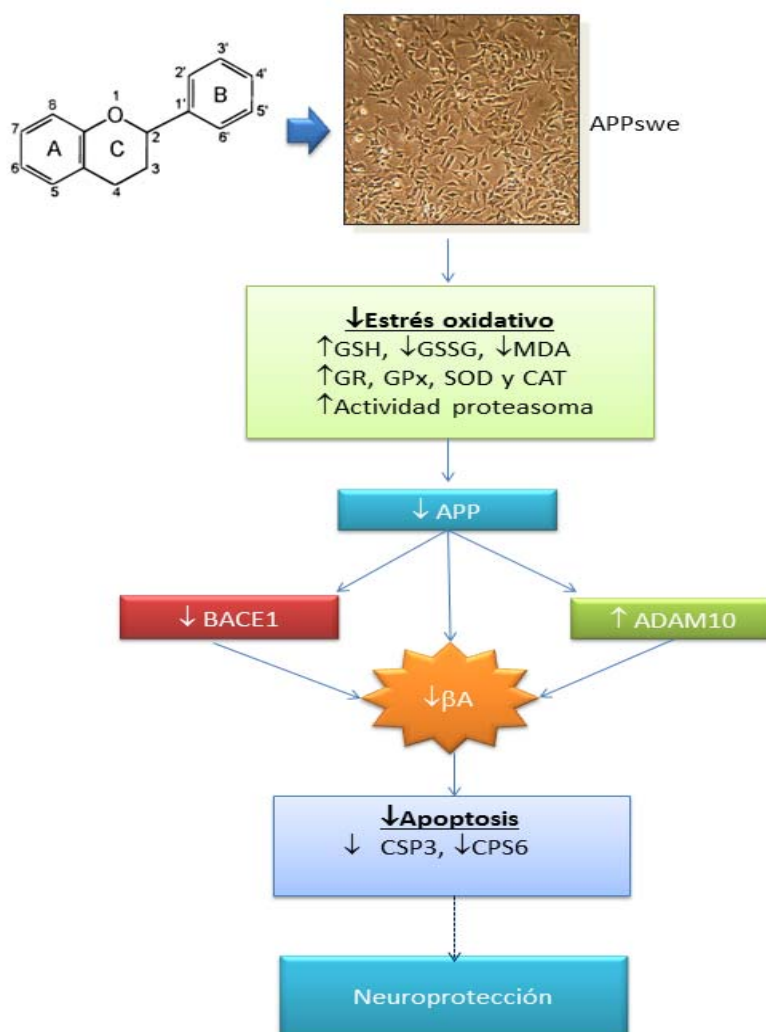


Figura 48. Dianas terapéuticas en las que podrían actuar quercetina y rutina en la línea celular transgénica APP^{swe}

El trabajo experimental que se llevó a cabo para la consecución de los objetivos descritos es el siguiente:

1. Valorar parámetros de estrés oxidativo:
 - a. Niveles de glutathion tanto en la forma reducida como la oxidada y el poder reductor celular
 - b. Niveles de peroxidación lipídica
 - c. Enzimas antioxidantes: Superóxido dismutasa (SOD); Catalasa (CAT); Glutathion peroxidasa (GPx) y Glutathion reductasa (GR). Determinación tanto de la actividad enzimática, niveles y la expresión génica
2. Cuantificar la actividad enzimática del proteasoma 20S y 26S
3. Determinar tanto los niveles como la expresión de PARP
4. Evaluar el procesamiento de APP:
 - a. Determinación de los niveles y la expresión génica de APP
 - b. Enzimas implicadas en su procesamiento: β -secretasa y α -secretasa, determinación de los niveles y expresión
5. Medir la actividad y la expresión de caspasas 3 y 6

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diversos trabajos de investigación han identificado diferentes factores que intervienen en la patogénesis de la EA, sin embargo los mecanismos relacionados con el proceso neurodegenerativo no se encuentran del todo claros. Se destaca el importante papel que ejerce el estrés oxidativo en la EA (Lovell and Markesbery, 2007; Markesbery and Lovell, 2007). Se ha observado que pacientes con EA muestran una marcada disminución de las defensas antioxidantes (Kim et al., 2006; Minghetti et al., 2006). Es importante destacar que el incremento de los marcadores de estrés oxidativo precede a la agregación del β A y a la aparición de los ONF, lo que sugiere que el estrés oxidativo podría ser un evento temprano involucrado en la patogénesis de la EA (Dumont and Beal, 2011; Choi et al., 2012).

Por tanto, moléculas antiamiloidogénicas y antioxidantes podrían ser potencialmente útiles en la prevención de esta patología, por este motivo decidimos corroborar el perfil antioxidante de quercetina y rutina en la línea celular transgénica de neuroblastoma humano APPswe.

2.1. GLUTATION Y SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

Para evaluar el efecto de quercetina y rutina sobre los niveles de glutatión, se trataron las células APPswe con quercetina y rutina a las concentraciones de 25, 50 y 100 η M durante 24 h. Transcurrido el tiempo de tratamiento, se recogieron las células y se lisaron para la determinación de los niveles de GSH, GSSG y la relación GSH/GSSG como marcador del poder reductor celular.

En la Tabla 24, se presentan los resultados obtenidos expresados en η moles/mg de proteína.

		GSH (η mol/mg prot)	GSSG (η mol/mg prot)	GSH/GSSG	MDA (η moles/mg prot)
APPswe	Control	12,68 \pm 1,69	3,82 \pm 0,10	3,72 \pm 0,6	13 \pm 0,06
	Quercetina 25 nM	14,81 \pm 0,56	3,29 \pm 0,18	4,20 \pm 0,2	10,03 \pm 0,06**
	50 nM	14,21 \pm 1,15	3,28 \pm 0,13	4,33 \pm 0,29	9,57 \pm 0,06**
	100 nM	16,20 \pm 0,84*	3,40 \pm 0,20	4,80 \pm 0,28	6,78 \pm 0,09**
	Rutina 25 nM	15,73 \pm 1,02*	2,55 \pm 0,14*	6,18 \pm 0,31*	12,5 \pm 0,06
	50 nM	17,86 \pm 1,19*	2,74 \pm 0,08*	6,51 \pm 0,39*	9,57 \pm 0,03**
	100 nM	19,63 \pm 1,41*	2,50 \pm 0,15*	7,94 \pm 0,74*	7,26 \pm 0,04**

* $p < 0,05$ ** $p < 0,001$ frente a APPswe control (Test Student-Newman-Keuls)

Tanto quercetina como rutina fueron capaces de aumentar los niveles de GSH con respecto a las células APPswe control. Mientras que quercetina a 100 η M provocó un incremento del 27,8% ($p < 0,05$) de los niveles de GSH, rutina fue capaz de aumentarlos a todas las concentraciones ensayadas de forma concentración dependiente ($p < 0,05$), siendo los porcentajes de incremento con respecto a las células control de 24, 40 y 54 % para 25, 50 y 100 η M respectivamente.

Con respecto al GSSG, sólo rutina disminuyó sus niveles de forma significativa ($p < 0,05$) a las tres concentraciones ensayadas en más del 34%, con respecto a las células APPswe control.

No obstante, ambos flavonoides incrementaron el poder reductor celular (GSH/GSSG) a las tres concentraciones ensayadas, aunque dicho incremento solamente fue significativo en el caso de rutina (66, 75 y 113 %) ($p < 0,05$).

Las variaciones que ejercen de forma leve quercetina y de forma más acusada rutina, sobre los niveles de GSH, GSSG y (GSH/GSSG), podrían estar relacionadas con variaciones en las actividades enzimáticas de GR, GPx-Se, CAT y SOD, ya que son las principales enzimas de defensa antioxidante.

En la EA, el estrés oxidativo, posiblemente desencadenado por los agregados amorfos del péptido β A, incrementan el grado de peroxidación lipídica, especialmente a nivel de corteza cerebral y de hipocampo. Estudios *post-mortem* revelan un aumento de los productos de peroxidación lipídica como TBARS, MDA, HNE, acroleína, etc. (McIntosh et al., 1997), (Pratico et al., 2001; Liu et al., 2005; Casado et al., 2008; Reed et al., 2009). También, se ha descrito la presencia de estos agregados amiloideos en la membrana mitocondrial neuronal (Reddy, 2009; Sultana and Butterfield, 2009), interfiriendo con la integridad de la membrana y alterando la cadena transportadora de electrones, hecho que favorece la acumulación de radicales libres.

Compuestos como quercetina y rutina podrían evitar o inhibir el desarrollo de este proceso gracias a sus propiedades antioxidantes, motivo por el cual determinamos los niveles de MDA en el lisado celular después de las 24 horas de tratamiento. Los resultados se muestran en la Tabla 24, expresado como η moles/mg de proteína. Ambos flavonoides redujeron de forma concentración dependiente la liberación de la especie radicalaria MDA ($p < 0,001$). Los porcentajes de inhibición con respecto a las células APP^{Swe} control, fueron 22,8; 26,4 y 47,8% para quercetina a las concentraciones de 25, 50 y 100 η M y 26,4 y 44,2% para rutina a las concentraciones de 50 y 100 η M, respectivamente.

2.2. ENZIMAS ANTIOXIDANTES: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA, NIVELES DE PROTEÍNA Y EXPRESIÓN

Se ha descrito que en la EA el sistema antioxidante constituido por las enzimas SOD, CAT, GR y GPx se encuentra marcadamente disminuido, razón por la cual las neuronas no pueden hacer frente al estrés oxidativo que se presenta durante el desarrollo de la enfermedad. En este sentido decidimos evaluar el efecto de los tratamientos sobre la actividad enzimática, niveles proteicos y expresión génica de estas enzimas.

Tras el tratamiento con los flavonoides durante 24 h, la actividad enzimática se determinó en el extracto citosólico, mientras que los niveles de proteína se cuantificaron en un extracto total. Tras la cuantificación de las bandas obtenidas en el western blot, los valores se normalizaron con su correspondiente β -actina. Las variaciones fueron expresadas con respecto a las células APP^{Swe} control. Para los estudios de expresión génica, como producto de partida se utilizó el ARN^{total}, y mediante transcripción reversa se sintetizó el ADN^c. En las gráficas de expresión génica se representan la variación del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ con respecto a las células APP^{Swe} control. Este valor expresa el número de veces que se incrementa o disminuye el ADN^c de cada gen con respecto a las células APP^{Swe} control.

Los resultados obtenidos para SOD se muestran en la Figura 49.

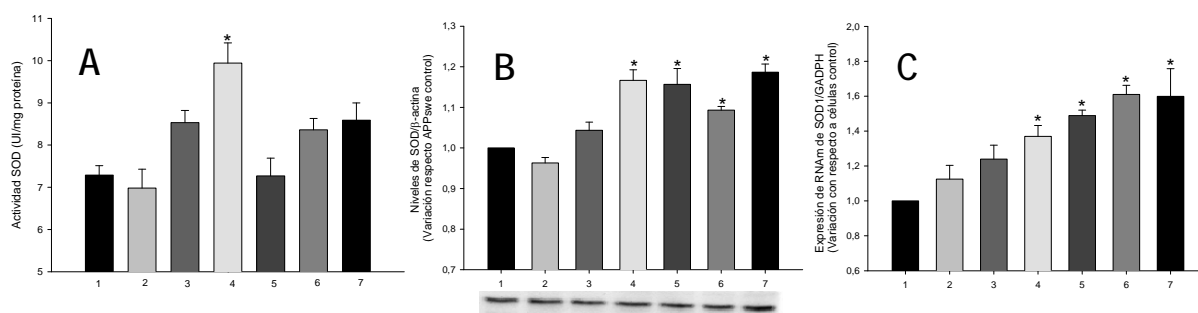


Figura 49. SOD (A) Actividad enzimática; (B) Western blot; (C) Expresión génica de SOD. 1. Células APP^{Swe} control. Tratamientos con quercetina 2. 25, 3. 50, 4. 100 η M. Tratamientos con rutina 5. 25, 6. 50, 7. 100 η M. * $p < 0,05$ frente a células APP^{Swe} control. (Test Student-Newman-Keuls).

En cuanto a la SOD, el tratamiento con quercetina produce un aumento tanto de la actividad enzimática, los niveles de proteína y la expresión génica, siendo significativo a la concentración de 100 η M ($p < 0,05$). El tratamiento con rutina produjo un aumento significativo, a todas las concentraciones ensayadas, tanto en los niveles de proteína como en la expresión ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos para CAT se muestran en la Figura 50.

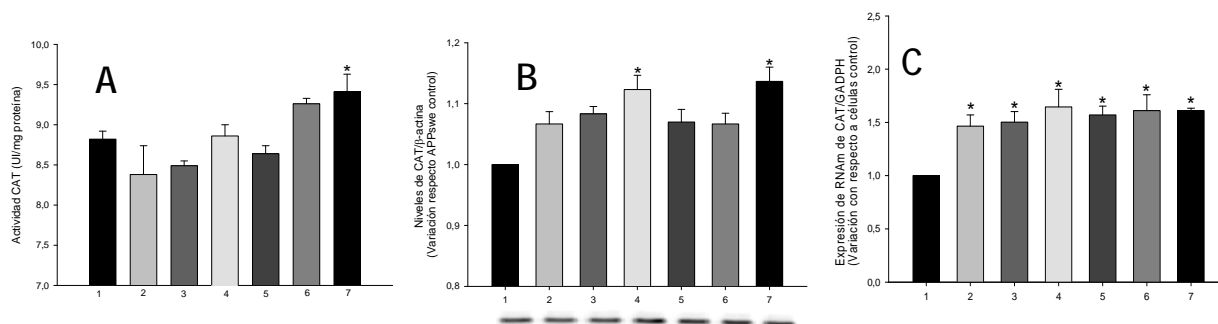


Figura 50. CAT (A) Actividad enzimática; (B) Western blot; (C) Expresión génica de SOD. 1. Células APPswe control. Tratamientos con quercetina 2. 25, 3. 50, 4. 100 η M. Tratamientos con rutina 5. 25, 6. 50, 7. 100 η M. * $p < 0,05$ frente a células APPswe control. (Test Student-Newman-Keuls).

En relación a CAT, los tratamientos tanto con quercetina como con rutina, produjeron un aumento significativo tanto de los niveles de proteína como de la expresión génica a la concentración de 100 η M ($p < 0,05$). Además, la rutina aumentó la actividad enzimática a dicha concentración ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos para GR se muestran en la Figura 51.

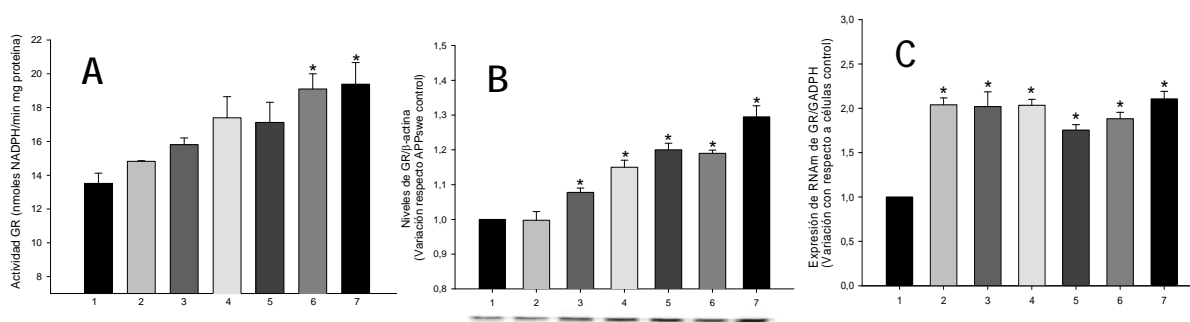


Figura 51. GR (A) Actividad enzimática; (B) Western blot; (C) Expresión génica de SOD. 1. Células APPswe control. Tratamientos con quercetina 2. 25, 3. 50, 4. 100 η M. Tratamientos con rutina 5. 25, 6. 50, 7. 100 η M. * $p < 0,05$ frente a células APPswe control. (Test Student-Newman-Keuls).

En relación a la GR, el tratamiento tanto con quercetina como con rutina, desencadenó un aumento significativo tanto de los niveles de proteína como de la expresión génica a las concentraciones de 50 y 100 η M ($p < 0,05$). Por su parte, rutina incrementó de forma significativa la actividad enzimática a dichas concentraciones ensayadas ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos para GPx se muestran en la Figura 52. El tratamiento con quercetina no produjo modificaciones ni en la actividad enzimática ni en los niveles de proteína, y solamente a la concentración de 100 η M produjo un aumento significativo en la expresión génica ($p < 0,05$). El tratamiento con rutina generó un aumento significativo tanto en los niveles de proteína como en la expresión a la concentración más alta ($p < 0,05$).

Los resultados observados en la expresión génica se correlacionan con la cuantificación de la actividad enzimática y la determinación de los niveles proteicos de las enzimas antioxidantes.

La célula posee diversos mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo. El primer sistema de defensa está formado por los compuestos antioxidantes capaces de interaccionar directamente con los radicales libres; tales como la vitamina C, GSH, ácido lipoico, en este grupo podríamos incluir a los flavonoides que consumimos en la dieta, etc. En segundo mecanismo de defensa lo constituyen las enzimas antioxidantes como SOD, CAT, GPx, etc., y en tercer lugar tenemos los sistemas de reparación de proteínas entre los que se incluye la tioredoxina reductasa, glutatión reductasa y el sistema proteasomal, etc. En la EA, la liberación de radicales libres sobrepasa los mecanismos de defensa celular; por tanto, interesa la búsqueda de compuestos capaces de influir positivamente a nivel de estos tres sistemas.

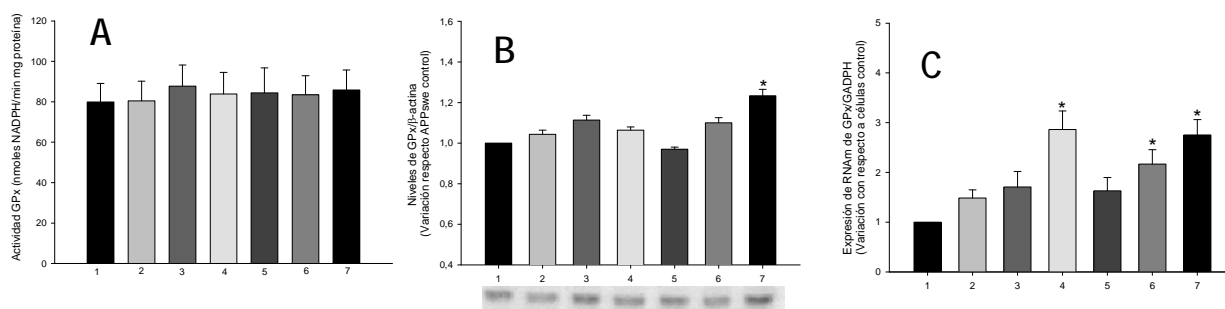


Figura 52. GPx (A) Actividad enzimática; (B) Western blot; (C) Expresión génica de SOD. 1. Células APP^{Swe} control. Tratamientos con quercetina 2. 25, 3. 50, 4. 100 μ M. Tratamientos con rutina 5. 25, 6. 50, 7. 100 μ M. * $p < 0,05$ frente a células APP^{Swe} control. (Test Student-Newman-Keuls).

Los experimentos descritos hasta el momento demuestran que tanto quercetina y rutina en mayor o menor grado, podrían intervenir a nivel de los tres mecanismos de defensa que presenta la célula frente al estrés oxidativo. Gracias al efecto antioxidante intrínseco que poseen quercetina y rutina, podrían actuar a nivel del primer mecanismo de defensa, interaccionando directamente con los radicales libres. Además, se observó que son capaces de incrementar los niveles de GSH y por ende aumentar el poder reductor celular. Se ha descrito que flavonoides a bajas concentraciones estimulan la transactivación del promotor de la subunidad catalítica de la γ -glutamylcisteína sintetasa, gen fundamental en la síntesis de glutatión (Wild and Mulcahy, 2000; Myhrstad et al., 2002).

A nivel del segundo mecanismo de defensa se vio que producen un incremento tanto en la actividad, niveles y expresión de las principales enzimas antioxidantes. Este aumento generalizado de la capacidad antioxidante endógena también se ha descrito con extractos vegetales ricos en quercetina y rutina (Sun et al., 2011).

2.3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL PROTEASOMA 20S Y 26S. NIVELES Y EXPRESIÓN DE PARP

En la Figura 53, se muestran los resultados obtenidos. Tras 24 horas, los tratamientos con quercetina y rutina a las concentraciones de 25, 50 y 100 μ M, incrementaron de forma significativa ($p < 0,05$) la actividad enzimática tanto del proteasoma 20S como del 26S con respecto a las células control.

Alrededor del 80-90% de las proteínas intracelulares, incluyendo las proteínas nucleares, son degradadas por el proteasoma. Este complejo multicatalítico se encarga del control de calidad de las proteínas oxidadas, desnaturalizadas y/o agregadas (Kopito and Sitia, 2000; Davies, 2001; Ulrich, 2002). El núcleo catalítico lo conforma el proteasoma 20S, compuesto por las subunidades α y β . La unión del sistema regulador 19S al proteasoma 20S da lugar a la formación del proteasoma 26S, este complejo catalítico es conocido como el UPS.

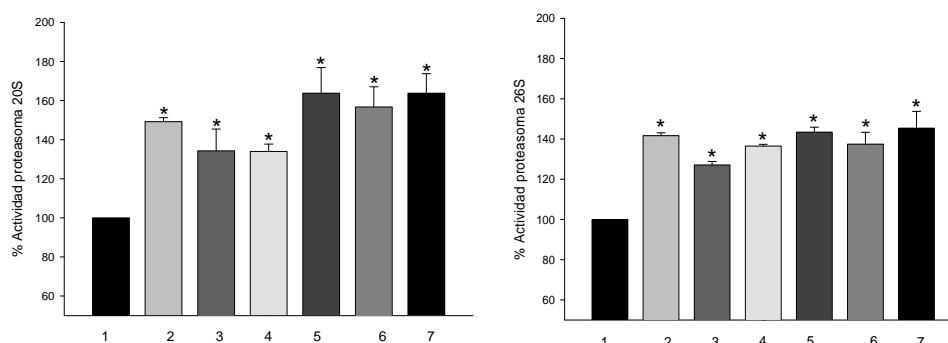


Figura 53. Actividad enzimática del proteasoma 20S y 26S. 1. APPswe control. Tratamientos con quercetina 2. 25, 3. 50, y 4. 100 nM. Tratamientos con rutina 5. 25, 6. 50 y 7. 100 nM. * $p < 0,05$ frente a APPswe control. (Test Student-Newman-Keuls).

Diversos autores, postulan que la inhibición del proteasoma podría ser responsable de la neurotoxicidad asociada al estrés oxidativo (Ding and Keller, 2001). La actividad del proteasoma está regulada por el estrés oxidativo. En la Figura 54 se esquematiza la relación entre el grado de oxidación de las proteínas y la degradación por el sistema proteasomal. En la parte izquierda de la figura se representa la forma activa de una proteína nativa. En el estadio I se incluyen a las proteína ligeramente oxidadas con actividad disminuida, en el estadio II, encontramos aquellas proteínas inactivas oxidadas y desnaturalizadas, que son reconocidas por el proteasoma para su degradación, la forma en que el proteasoma 20S reconoce a estas proteínas dañadas no está clara pero se piensa que pueden intervenir varios factores: (a) reconocimiento de grupos hidrófobicos que quedan expuestos después de la modificación; (b) reconocimiento de marcadores, como residuos de aminoácidos oxidados y (3) reconocimiento de cambios conformacionales en la proteína dañada. En el estadio III, la proteína se encuentra excesivamente oxidada formando enlaces covalentes cruzados con otras proteínas desnaturalizadas, favoreciendo la formación de agregados proteicos que actúan como inhibidores del proteasoma. Los agregados formados exponen residuos hidrofóbicos que favorecen la peroxidación lipídica, liberando a su paso MDA, HNE como subproductos (Jung et al., 2007; Jung and Grune, 2008).

Se ha descrito que la inhibición farmacológica del proteasoma es suficiente para inducir muerte neuronal (Keller et al., 2000b; Pasquini et al., 2000; Qiu et al., 2000; McNaught et al., 2002). También se ha propuesto que la inhibición de este sistema multienzimático podría ser responsable de la neurodegeneración desencadenada en la EA. Además, se ha demostrado una disminución significativa de la actividad del proteasoma en diferentes áreas cerebrales; tales como, hipocampo, parahipocampo, giro temporal medio y lóbulo parietal inferior, en pacientes con la EA (Keller et al., 2000a).

El proteasoma 26S es dependiente de ATP y para degradar una proteína dañada, requiere el marcaje con ubiquitina, mientras que el proteasoma 20S no requiere marcaje de ubiquitina y es independiente de ATP. Se ha demostrado que el sistema proteasomal 26S es más susceptible al estrés oxidativo con respecto al 20S. En cortes histológicos cerebrales de pacientes con EA, se ha observado un incremento significativo de agregados proteicos marcados con ubiquitina, a nivel de los ONF (Reinheckel et al., 2000).

Una nueva estrategia para el tratamiento de la EA sería la búsqueda de compuestos activadores del proteasoma. Se ha demostrado que el incremento de la actividad del proteasoma promueve la resistencia celular al estrés oxidativo y aumenta la supervivencia celular (Chondrogianni and Gonos, 2008).

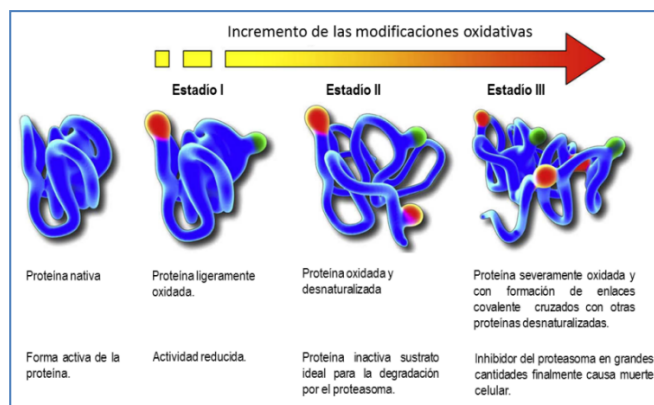


Figura 54. Grado de oxidación de las proteínas y su susceptibilidad a la degradación por el proteasoma

La actividad antitumoral de flavonoides, entre ellos la quercetina, se ha atribuido a su efecto inhibitorio en la actividad del proteasoma. Dicha actividad antitumoral se produce a concentraciones elevadas de flavonoides ($> 40 \mu\text{M}$). A estas concentraciones el flavonoide se convierte en una especie activa de oxígeno y de esta forma activa los mecanismos apoptóticos celulares (Chen et al., 2005a). Por otro lado, estudios recientes han demostrado que dosis bajas de quercetina producen una activación del proteasoma (Vargas and Burd, 2010). Estos últimos hallazgos están en concordancia con nuestros resultados, ya que tanto las células tratadas con quercetina como rutina han experimentado un incremento significativo de la actividad *CT-L* tanto del proteasoma 20S como del 26S a concentraciones de flavonoide del orden nanomolar. Hasta la fecha, pocos compuestos han mostrado un efecto activador del proteasoma (Katsiki et al., 2007; Maher, 2008; Trippier et al., 2014)

A nivel del núcleo se ha descrito que el sistema proteasomal se activa por modificación de la poli(ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP) durante el estrés oxidativo (Ullrich et al., 1999). PARP activa el proteasoma para promover la degradación selectiva de histonas oxidadas, además de reparar el ADN y eliminar las proteínas oxidadas, facilitando la adaptación al estrés oxidativo y manteniendo la viabilidad celular a nivel del núcleo (Arnold and Grune, 2002).

El incremento en la actividad del proteasoma 20S y 26S que se observó con los tratamientos de quercetina y rutina, nos condujo a evaluar el efecto de los tratamientos sobre los niveles de PARP mediante western blot y la expresión génica por PCR en tiempo real.

En la Figura 55, se presentan los resultados obtenidos.

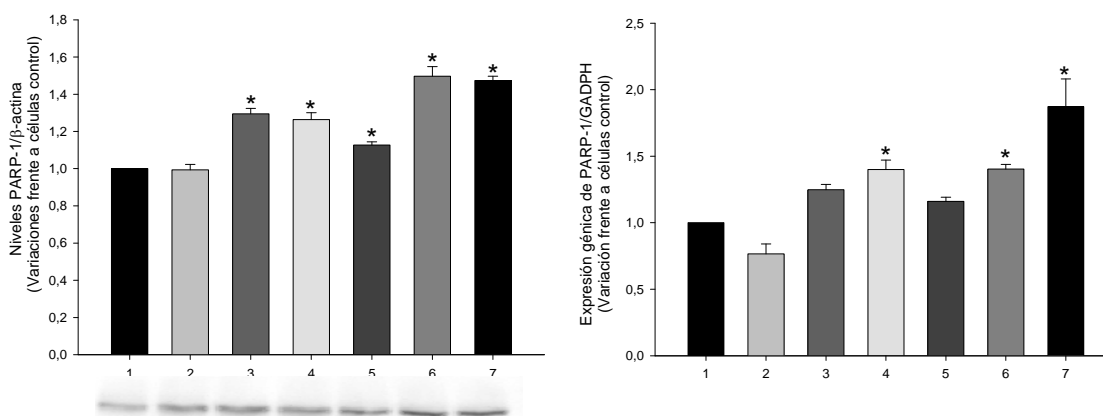


Figura 55. Western blot y cuantificación de la expresión génica del ARNm de PARP. 1. APPswe control. Tratamientos con quercetina 2. 25, 3. 50, y 4. 100 ηM . Tratamientos con rutina 5. 25, 6. 50 y 7. 100 ηM . * $p < 0,05$ frente a APPswe control. (Test Student-Newman-Keuls).

Ambos flavonoides incrementaron los niveles de PARP, de forma más acusada para los tratamientos con rutina, que fue capaz de incrementar en 38,3% los niveles proteicos PARP a la concentración de 100 η M, de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$). A nivel de la expresión génica se observó que quercetina a la concentración de 100 η M incrementó la síntesis del ARNm de PARP en un 40%. En el caso de los tratamientos con rutina, a las concentraciones más altas (50 y 100 η M), obtenidos por western blot se correlacionaron con los obtenidos mediante PCR en tiempo real, ya que fueron capaces de favorecer la expresión del ARNm de PARP, comparados con las células control, en 40,3 y 87,3%, respectivamente ($p < 0,05$).

Arnold y Grune 2002, proponen que la activación del proteasoma 20S está asociada a la actividad PARP durante el estrés oxidativo, de manera que el aumento en la actividad del PARP favorecerá la reparación del ADN dañado y por tanto aumentará la viabilidad celular (Arnold and Grune, 2002). Nuestros resultados apoyan esta teoría, ya que posiblemente frente al estrés oxidativo desencadenado por la sobreexpresión de APP^{swe}, en la línea transgénica; tanto, quercetina como rutina favorecen la expresión proteica y génica de PARP. Se ha descrito que el sistema proteasomal en primera línea intenta reparar las proteínas dañadas por acción de la chaperonas tales como las HSP40 y 70, posiblemente a nivel del estadio I de oxidación de las proteínas (Figura 54). Este mecanismo es importante en la búsqueda de moléculas neuroprotectoras, ya que de esta forma se prevendría la formación de agregados proteicos como las placas seniles y los ONF, en el caso de la EA.

Los compuestos en estudio, podrían participar a nivel de la reparación de las proteínas levemente oxidadas, asimismo favorecer la degradación de las proteínas desnaturalizadas por oxidación y por último inhibir la formación de los agregados proteicos sumado al efecto antimailoidogénico y antioxidante que poseen. En base a las propiedades antioxidantes, descritas para quercetina y rutina, éstas podrían disminuir el estrés oxidativo desencadenado por la agregación del péptido y por ende generar cambios a nivel de APP y a nivel de las proteínas encargadas de su procesamiento como son la BACE y α -secretasa. Por tal motivo decidimos evaluar los niveles proteicos y la expresión génica de dichas proteínas para determinar el efecto provocado por quercetina y rutina tras 24 h de tratamiento a las concentraciones de 25, 50 y 100 η M.

2.4. PROCESAMIENTO DE APP

Nikolaev y col. el año 2009, reportaron la implicación de APP en la neurodegeneración vía el receptor de muerte DR6 (un miembro de la familia TNF α), vía que estaría asociada a la ruta amiloidogénica de APP. El procesamiento de APP se inicia con la actividad catalítica de la enzima BACE, dejando libre β -APPs y APP-C99 que contiene la secuencia β A completa. En esta ruta de neurodegeneración, el fragmento N-terminal β -APPs sufriría un segundo corte por una proteasa aún desconocida, liberándose el dominio E2 y una secuencia N-APP, la cual actuaría como ligando del receptor de muerte DR6, desencadenando la cascada de apoptosis por activación de las caspasas (Nikolaev et al., 2009).

En la Figura 56, se esquematiza la vía de activación de DR6 por el N-APP. De estos estudios se deduce la importancia de buscar compuestos inhibidores de la expresión de APP, los cuales podrían ser potencialmente activos para el tratamiento de la EA.

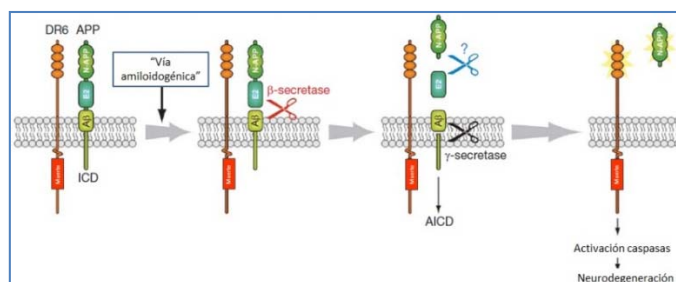


Figura 56. Mecanismo de acción de N-APP vía el receptor de muerte DR6 (Nikolaev et al., 2009)

Tras 24 horas de tratamiento con quercetina y rutina a 25, 50 100 η M, se compararon los niveles proteicos y de ARNm de APP con respecto a las células control. Los resultados se muestran en la Figura 57.

Se observó una disminución tanto de los niveles como la expresión de APP especialmente con rutina, cuyo efecto fue concentración dependiente ($p < 0,05$).

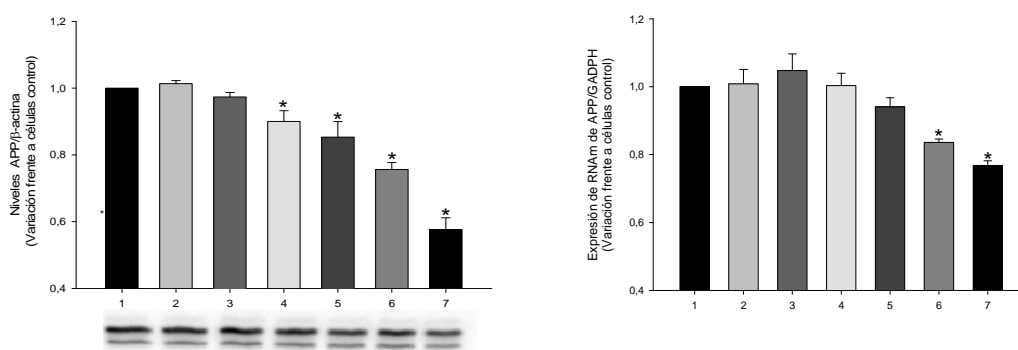


Figura 57. Western blot y cuantificación de la expresión génica del ARNm de APP. 1. APP^{swe} control. Tratamientos con quercetina 2. 25, 3. 50, y 4. 100 η M. Tratamientos con rutina 5. 25, 6. 50 y 7. 100 η M. * $p < 0,05$ frente a APP^{swe} control. (Test Student-Newman-Keuls).

Siguiendo la ruta amiloidogénica, nos interesamos por el procesamiento de BACE, ya que es la primera enzima que interviene en esta ruta metabólica. Se evaluó un producto de degradación de la enzima BACE, mediante western blot, para determinar la influencia de los tratamientos sobre el procesamiento de la misma. Los niveles de este fragmento de degradación de 40 kDa son inversamente proporcionales a la cantidad de proteína madura, por tanto podrían ser interesantes aquellos compuestos que favorezcan la degradación de la proteína madura. En la Figura 58, se puede observar los resultados obtenidos, tras 24 h de tratamiento y comparados con respecto a las células APP^{swe} control.

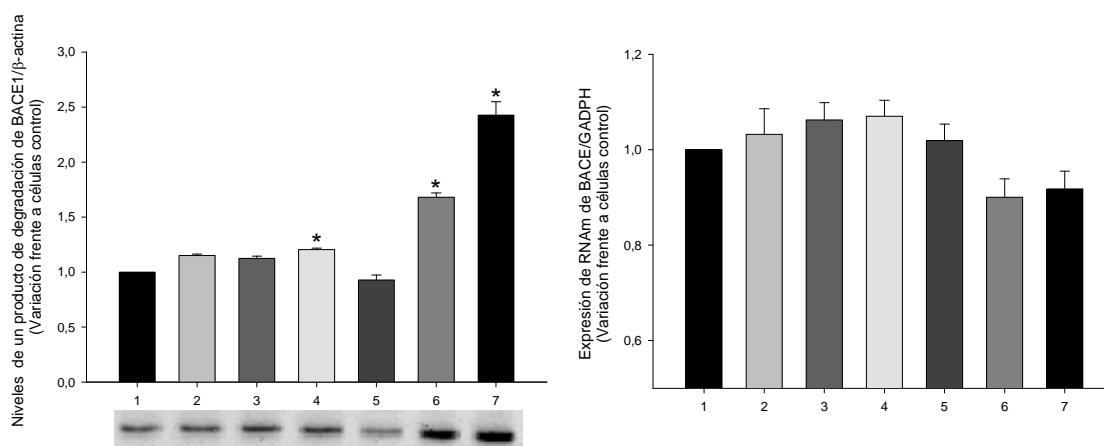


Figura 58. Western blot de un producto de degradación de BACE de 40 kDa y cuantificación de la expresión génica del ARNm de BACE. 1. APP^{swe} control. Tratamientos con quercetina 2. 25, 3. 50, y 4. 100 η M. Tratamientos con rutina 5. 25, 6. 50 y 7. 100 η M. * $p < 0,05$ frente a APP^{swe} control. (Test Student-Newman-Keuls).

Mientras que quercetina a la concentración de 100 η M incrementó más del 20% el producto de degradación de BACE ($p < 0,05$), rutina incrementó de forma más acusada los niveles proteicos de este producto de degradación a las concentraciones de 50 y 100 η M en 71,7 y 156,2% respectivamente, con respecto a las células control ($p < 0,05$).

La expresión génica del ARNm de BACE, no evidenció cambios significativos con los tratamientos de quercetina comparadas con las células APP^{swe} control (Figura 58).

Con respecto a la ruta "no amiloidogénica" de APP, nos interesaba determinar el efecto de los tratamientos sobre la enzima α -secretasa. Esta enzima hidroliza la APP entre las posiciones 16/17 del β A, generando α -APPs, que contiene un fragmento de la región β A, y el fragmento APP-C83 de 11,5 kDa que queda anclado a la membrana. El fragmento transmembrana APP-C83, sufrirá un segundo corte por la γ -secretasa, liberando el fragmento p3 que no posee la secuencia β A completa y que carece de potencial amiloidogénico (Panegyres, 1997) y el AICD.

Para el tratamiento de la EA, nos interesan aquellos compuestos que sean capaces de favorecer la ruta "no amiloidogénica", esencialmente activadores de la enzima α -secretasa, la cual está compuesta por la familia de metaloproteasas conocidas como ADAM, a la que pertenecen las isoformas ADAM-9, ADAM-10 y ADAM-17, siendo ADAM-10 la isoforma constitutiva fisiológicamente más importante. Por este motivo evaluamos el efecto de quercetina y rutina sobre los niveles proteicos de ADAM-10 y la expresión génica de la misma.

En la Figura 59, se puede observar los niveles de ADAM10 obtenidos por western blot, y la cuantificación del ARNm de la misma por PCR en tiempo real.

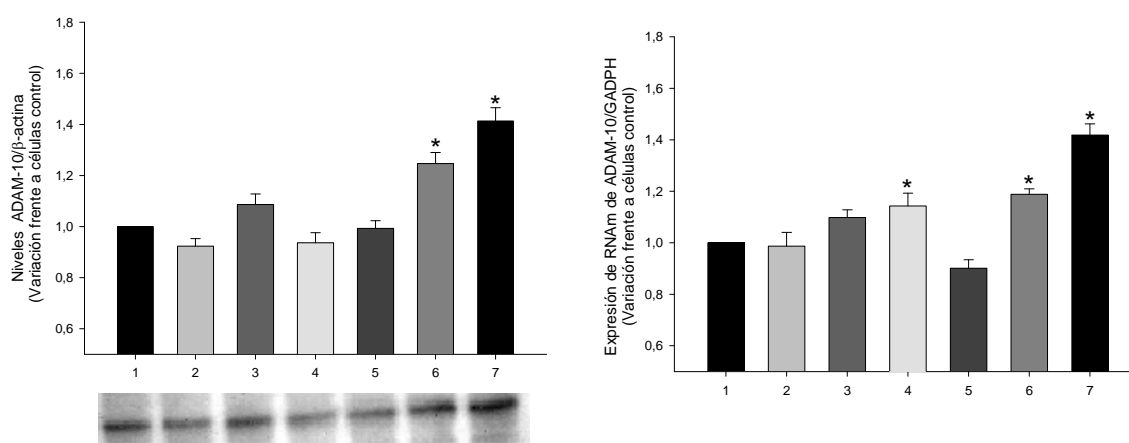


Figura 59. Western blot y cuantificación de la expresión génica del ARNm de ADAM-10. 1. APPswe control. Tratamientos con quercetina 2. 25, 3. 50, y 4. 100 μ M. Tratamientos con rutina 5. 25, 6. 50 y 7. 100 μ M. * $p < 0,05$ frente a APPswe control. (Test Student-Newman-Keuls).

Los tratamientos con rutina a 50 y 100 μ M, incrementaron significativamente y de forma concentración-dependiente los niveles proteicos de ADAM-10, siendo los porcentajes de incremento con respecto a las células APPswe sin tratamiento, de 22,3 y 38,5% respectivamente ($p < 0,05$).

Con respecto a la expresión génica del ARNm de ADAM-10 (Figura 59), quercetina a la concentración de 100 μ M incrementó dichos niveles en un 14,3% de forma significativa ($p < 0,05$), con respecto a las células control. El incremento de los niveles proteicos de ADAM-10 que provocó rutina, también se observó en los niveles de ARNm en 18,9 y 41,9% de forma significativa y concentración dependiente ($p < 0,001$) a las concentraciones de 50 y 100 μ M, respectivamente.

De los resultados obtenidos tanto *in vitro* como en el modelo celular, rutina presenta propiedades antioxidantes y efectos antiamiloidogénicos ya que inhibe la agregación de β A, desagrega las fibrillas de β A preformadas, inhibe la actividad BACE *in vitro* y su expresión en el modelo celular. Además, disminuye tanto la expresión como los niveles de APP, e incrementa tanto la expresión como los niveles de ADAM-10. Estas actividades observadas con rutina promueven el procesamiento de APP a través de la vía no amiloidogénica disminuyendo la posibilidad de generar β A. Nuestros resultados se corroboran con diversos estudios que evidencian el papel que pueden ejercer los flavonoides induciendo α -secretasa (Obregon et al., 2006), y disminuyendo la expresión tanto de APP como de BACE (Zhang et al., 2014).

Liao y col (2013), describieron la actividad neuroprotectora de genisteína, una isoflavona aislada de la soja, sobre cultivo primario de neuronas de hipocampo de rata. El tratamiento de las células con genisteína incrementó significativamente la viabilidad celular; además, aumentó significativamente la actividad de α -secretasa, mientras que en la actividad de BACE no se observaron cambios (Liao et al., 2013).

2.5. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y EXPRESIÓN GÉNICA DE CASPASA 3 Y 6

Conociendo la participación de caspasa 3 en el proceso neurodegenerativo inducido por el β A, nos propusimos evaluar el efecto de los compuestos sobre la actividad y la expresión génica de caspasa 3. Tras 24 horas de tratamiento en la línea celular APP^{swe}, se observó que tanto quercetina como rutina fueron capaces de inhibir significativamente la actividad enzimática de caspasa 3 a las concentraciones más altas. Los resultados se presentan en la Figura 60, siendo los porcentajes de inhibición para quercetina de 13 y 18%, y para rutina de 12,6 y 17,9% a las concentraciones de 50 y 100 η M, respectivamente. En la evaluación de la expresión génica (Figura 60), se observó una disminución de los niveles de ARNm de caspasa 3, que sólo fue significativa en el caso de rutina a la concentración de 100 η M ($p < 0,001$).

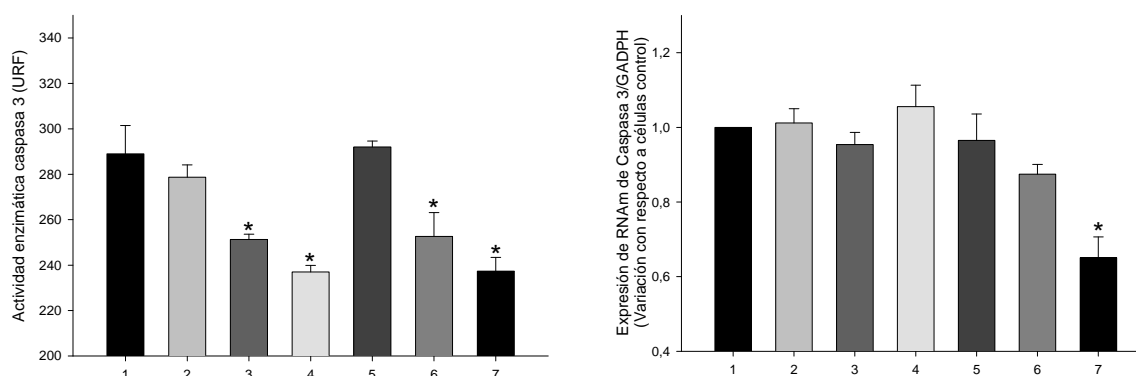


Figura 60. Cuantificación de la actividad enzimática y de la expresión génica del ARNm de caspasa 3. 1. APP^{swe} control. Tratamientos con quercetina 2. 25, 3. 50, y 4. 100 η M. Tratamientos con rutina 5. 25, 6. 50 y 7. 100 η M. * $p < 0,05$ frente a APP^{swe} control. (Test Student-Newman-Keuls).

Se ha demostrado que existe una correlación entre la activación de caspasas y su efecto en las enfermedades neurodegenerativas como la EA. Durante la apoptosis, la APP actúa como sustrato de las caspasas (predominantemente de la caspasa 3), cuya actividad catalítica hidroliza APP a nivel de la posición Asp664 (en base a la secuencia de APP695), liberando un fragmento C-terminal de 31 aminoácidos, llamado C31. Adicionalmente la actividad de γ -secretasa genera un fragmento llamado Jcasp (Gervais et al., 1999; Bredesen, 2009; Park et al., 2009), el procesamiento de APP por la caspasa 3 se esquematiza en la Figura 61.

Se ha reportado que C31 y Jcasp, poseen efectos citotóxicos, ya que su liberación favorece la neurodegeneración (Lu et al., 2003). Posiblemente, el procesamiento de APP por caspasa 3, potenciaría la neurotoxicidad inducida por el β A. La caspasa 3 juega un papel clave en el desarrollo de la EA, por tanto aquellos compuestos capaces de inhibir la actividad enzimática de la misma y/o disminuir su expresión génica podrían ser útiles en el tratamiento de la EA.

La neurodegeneración desencadenada por el receptor de muerte celular DR6 (Figura 61); además de la participación de caspasa 3, requiere la activación de caspasa 6. Nikolaev y col. 2009, evidenciaron la implicación de caspasa 6 a nivel de la degeneración axonal, mientras que caspasa 3 estaría relacionada con la degeneración a nivel del soma neuronal (Nikolaev et al., 2009). También, se ha reportado la intervención de caspasa 6 a nivel de la apoptosis celular, ya que actuaría favoreciendo

la fragmentación microtubular, provocando la desestabilización de los mismos por ruptura de los microtúbulos como Tau, favoreciendo la formación de ONF a nivel intracelular (Guo et al., 2004; Horowitz et al., 2004). Estudios a nivel proteómico han encontrado la asociación de caspasa 6 con los ONF, información que apoya la participación de esta caspasa a nivel de la agregación de Tau (Klaiman et al., 2008).

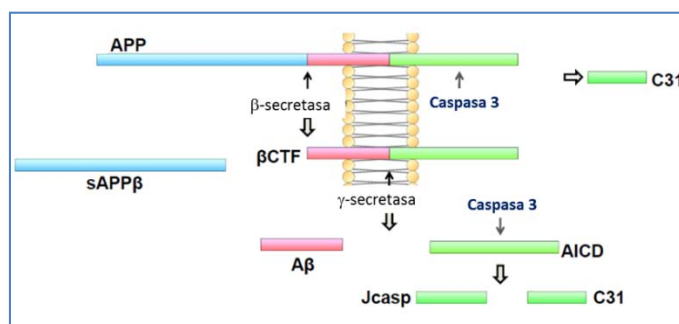


Figura 61. Implicación de caspasa 3 en el procesamiento de APP

Conocedores de la asociación existente entre la activación de caspasa 6 y el proceso neurodegenerativo neuronal iniciado por la secuencia N-APP vía el receptor de muerte DR6, decidimos evaluar el efecto de quercetina y rutina sobre la actividad enzimática de la misma y la expresión génica. Los resultados se presentan en la Figura 62. La actividad enzimática de caspasa 6 sólo se vio disminuida significativamente con los tratamientos de rutina a 50 y 100 η M, en más del 17 % ($p < 0,05$). A nivel de la expresión génica se observó una ligera disminución de los niveles del ARNm de caspasa 6 con respecto a las células control, pero no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas (Figura 62).

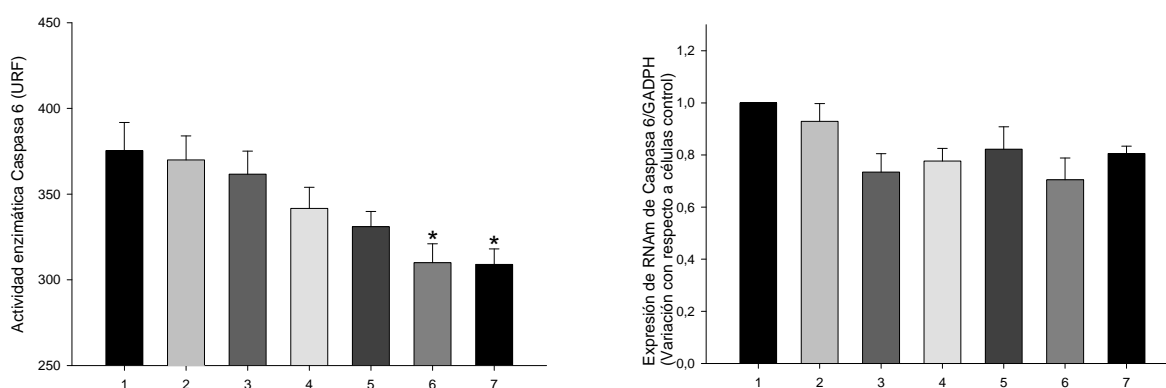


Figura 62. Cuantificación de la actividad enzimática y de la expresión génica del ARNm de caspasa 6. 1. APPswe control. Tratamientos con quercetina 2. 25, 3. 50, y 4. 100 η M. Tratamientos con rutina 5. 25, 6. 50 y 7. 100 η M. * $p < 0,05$ frente a APPswe control. (Test Student-Newman-Keuls).

Diversos trabajos apoyan el papel neuroprotector que ejercen los flavonoides, especialmente los que pertenecen a la subfamilia de los flavonoles. El glicósido de quercetina (3-O-beta-D-xilopiranosil-beta-D-galactopiranosido) inhibe la agregación del péptido β A. Además, reduce la muerte celular inducida por el β A de forma concentración y tiempo dependiente, previniendo la fragmentación del ADN y la activación de la caspasa 3 en la línea celular PC12. Los autores señalan que sus propiedades neuroprotectoras requieren la presencia del azúcar, ya que la aglicona no mostró propiedades neuroprotectoras (Choi et al., 2010). Del mismo modo, las mejores propiedades neuroprotectoras que muestra rutina con respecto a quercetina podrían deberse a la presencia del azúcar rutinosa en la posición 3. Aunque diversos estudios sugieren que los grupos funcionales básicos para que los flavonoides puedan ser neuroprotectores son la presencia del grupo carbonilo en la posición 4 y el doble enlace en la posición 2,3 del anillo C (Pu et al., 2007), ambos presentes tanto en quercetina como en rutina.

3. CONCLUSIONES DEL ESTUDIO EN LA LÍNEA CELULAR TRANSGÉNICA APP_{swe}

En la línea celular de neuroblastoma humano transfectada con el gen APP^{swe}, utilizada como modelo de Alzheimer experimental, se observó que:

1. Tanto quercetina como rutina fueron capaces de incrementar los niveles de glutatión reducido y por tanto el poder reductor celular, así como de disminuir los niveles de peroxidación lipídica.
2. El tratamiento de las células con ambos flavonoides favoreció en mayor o menor grado la actividad enzimática, la síntesis de proteína y la expresión génica de las principales enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa. Rutina produjo especialmente un incremento de catalasa y de glutatión reductasa, lo que podría explicar el aumento considerable de los niveles de glutatión reducido.
3. Tanto quercetina como rutina provocaron un incremento significativo en la actividad del proteasoma 20S y 26S en la línea celular en estudio, evento que promovería la resistencia celular al estrés oxidativo aumentando la supervivencia celular. Además, ambos flavonoides aumentaron los niveles y la expresión génica de PARP, proteína responsable de la reparación del ADN y de la activación del sistema proteasomal.
4. Rutina y quercetina provocaron una disminución de los niveles y expresión de APP, siendo rutina el flavonoide más activo. Además, el tratamiento de las células con rutina indujo un aumento de los niveles y expresión de ADAM-10, lo que podría favorecer la vía no amiloidogénica de procesamiento de APP.
5. Rutina fue capaz de inhibir la actividad enzimática y la expresión de caspasa 3 y caspasa 6. La inhibición farmacológica de estas proteasas puede ser de gran interés ya que APP puede ser sustrato de caspasas cuya hidrólisis enzimática puede liberar fragmentos neurotóxicos que favorecen la neurodegeneración.
6. Por tanto, en los ensayos en células se corroboró el buen perfil antioxidante de quercetina y rutina, así como la actividad antiamiloidogénica mostrada por ambos flavonoides en las técnicas *in vitro*.

“Estudio de la actividad
antiamiloidogénica y
neuroprotectora de quercetina
y rutina en el modelo de ratón
Tg2576”

1. OBJETIVOS DEL ESTUDIO EN EL MODELO DE RATÓN Tg2576

El potencial antioxidante y antiamiloidogénico que demostraron quercetina y rutina a nivel *in vitro* y en el modelo transgénico celular, indican que podrían ser potencialmente activas en el tratamiento de la EA. En este capítulo se evaluó la actividad metabólica cerebral, el efecto antiamiloidogénico, antioxidante y antiinflamatorio de los compuestos en el modelo animal Tg2576 (TgAPP). Este modelo constituye una herramienta útil para examinar diferentes vías de intervención para el tratamiento de la EA. En la Figura 63 se muestran las diferentes dianas farmacológicas que se evaluaron.

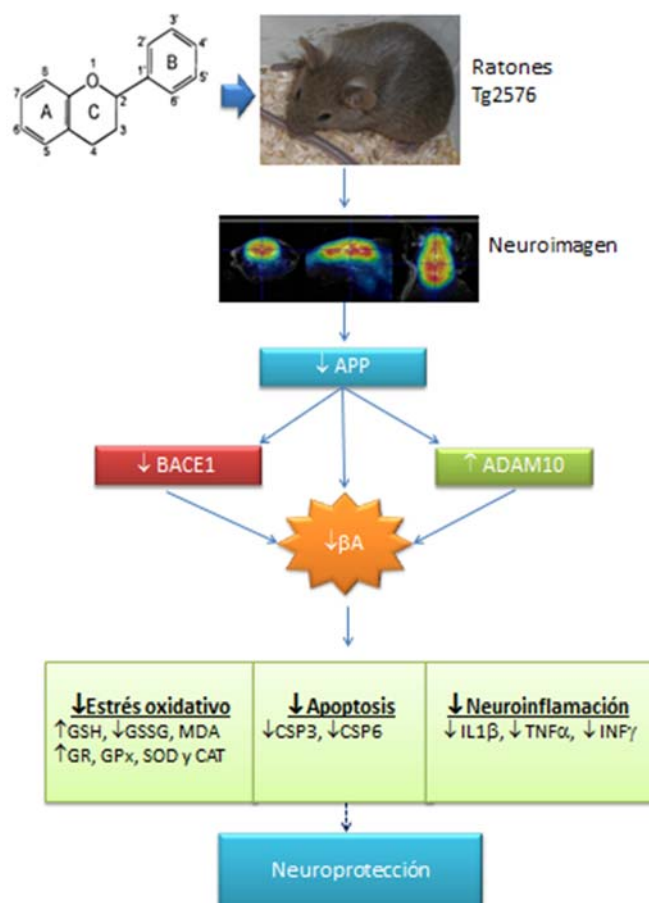


Figura 63. Dianas terapéuticas en las que podrían actuar quercetina y rutina en el modelo de ratón Tg2576.

El trabajo experimental que se llevó a cabo para la consecución de los objetivos descritos es el siguiente.

1. Evaluar la actividad metabólica cerebral
2. Evaluar la neurodegeneración
3. Determinar la expresión de receptores ionotrópicos de glutamato
4. Valorar parámetros de estrés oxidativo:
 - a. Glutacion: tanto la forma oxidada como la reducida
 - b. Peroxidación lipídica
 - c. Enzimas antioxidantes: Superóxido dismutasa (SOD); Catalasa (CAT); Glutacion peroxidasa (GPx) y Glutacion reductasa (GR). Determinación de la actividad enzimática y su expresión
5. Evaluar la expresión génica de APP y de las enzimas α -secretasa y β -secretasa
6. Cuantificar la expresión génica de las caspasas 3 y 6
7. Cuantificar la expresión génica de mediadores inflamatorios IL-1 β , TNF- α , INF- γ

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA CEREBRAL MEDIANTE PET EN RATONES MACHO DE 28 SEMANAS DE EDAD

Se decidió evaluar la captación de ^{18}F -FDG en el modelo animal TgAPP a las 28 semanas de edad, antes de la aparición de las placas neuríticas que se da a partir de los 14-16 meses de edad. La eventual detección de un déficit metabólico, en las fases iniciales de la patología, permitiría utilizar la ^{18}F -FDG como un marcador biológico predictivo de la enfermedad capaz de detectar la patología antes del inicio del proceso neurodegenerativo. Esta nueva tecnología aportaría datos directos del funcionamiento celular, posibilitando el estudio de nuevas moléculas potencialmente activas en el tratamiento de la EA, permitiendo evaluar *in vivo* el efecto de estos tratamientos durante el desarrollo de la enfermedad.

Sin embargo, la evaluación de la actividad metabólica cerebral a partir de las imágenes obtenidas mediante ^{18}F -FDG-PET muestra que no existen diferencias en la actividad metabólica global entre ratones macho de 28 semanas TgAPP ($n = 8$) con respecto a ratones WT ($n = 8$) de la misma edad. Para corregir las inevitables fluctuaciones tanto en la dosis inyectada como en el tiempo de incorporación desde el momento de la inyección hasta la realización del escáner, así como las variaciones en el peso y la glucemia de los diferentes animales las imágenes se normalizaron frente a cerebelo, estructura elegida como referencia. El análisis de la actividad metabólica en diferentes estructuras cerebrales, como hipocampo, corteza parietal y temporal, implicadas en las funciones cognitivas tampoco mostró cambios significativos en la actividad metabólica (Figura 64).

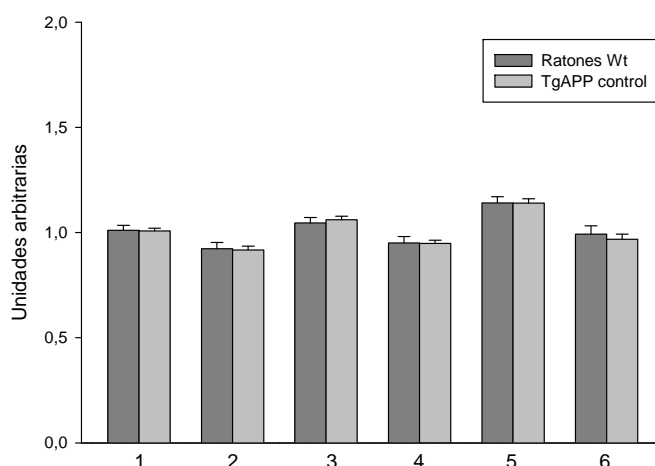


Figura 64. Efectos sobre la captación de glucosa, valorada mediante PET, comparando ratones WT con ratones TgAPP control. 1. Cerebro Total; 2. Corteza; 3. Hipocampo; 4. Neocorteza; 5. Tálamo; 6. Hipotálamo. Los datos muestran la captación de glucosa normalizada respecto a los niveles en cerebelo. Los valores representan la media \pm SEM.

En la Figura 65, se muestra una imagen representativa de un ratón WT comparado con un ratón TgAPP en la que se aprecia la ausencia de diferencias en la actividad metabólica cerebral entre ambos grupos.

La PET es una técnica no invasiva de diagnóstico por imagen capaz de estudiar, visualizar y cuantificar múltiples procesos bioquímicos y fisiológicos *in vivo*, tales como metabolismo energético, tasa de síntesis proteica, actividad enzimática, metabolismo de ácidos grasos, flujo sanguíneo, entre otros. La PET permite, por tanto, medir la actividad metabólica de los tejidos tras detectar la distribución que adopta en ellos un radiofármaco de vida media ultracorta tras ser administrado por vía intravenosa. El radiofármaco más utilizado en las aplicaciones neurológicas de la PET es el análogo de la glucosa ^{18}F -FDG. La glucosa es el principal sustrato energético del cerebro. La ^{18}F -FDG utiliza los mismos transportadores de membrana que la glucosa. Tras su entrada en la célula sufre atrapamiento metabólico

lo que da lugar a la acumulación progresiva del derivado fosforilado ^{18}F -FDG-6P en el interior de la célula.

En el cerebro el metabolismo glucídico aporta más del 95% de la energía necesaria para su funcionamiento normal. En múltiples enfermedades relacionadas con disfunciones cognitivas se han descrito alteraciones significativas en la utilización cerebral de la glucosa, de ahí que la ^{18}F -FDG sea un radiotrazador básico en el estudio de las funciones cerebrales dependientes de energía.

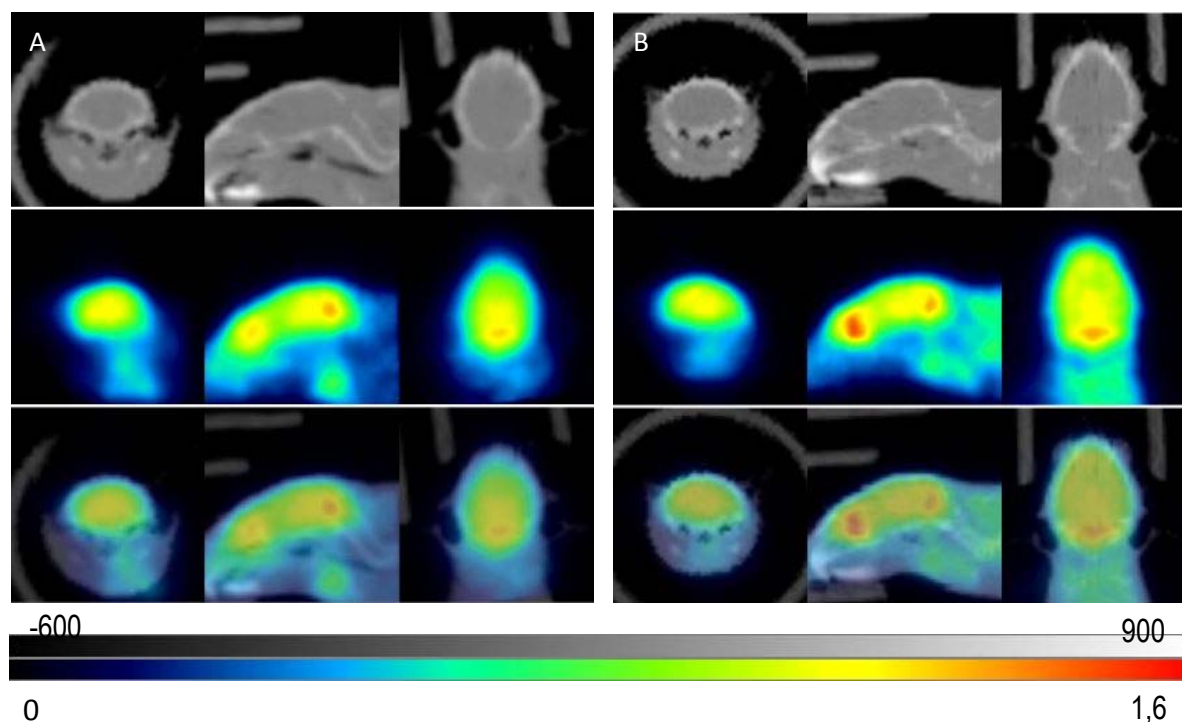


Figura 65. Imágenes de PET. En cada panel se observan, de arriba abajo: imágenes de MRI; imágenes de PET y superposición de ambos tipos de imágenes (en planos coronal, sagital y transversal). A. Ratón WT B. Ratón TgAPP control. Cuanto mayor sea la captación de glucosa, mayor será la señal, siendo el rojo el máximo y el azul el mínimo

En el caso de la EA, los pacientes muestran una disminución del metabolismo de la ^{18}F -FDG en la corteza parieto-temporal incluso en etapas tempranas de la enfermedad cuando los síntomas clínicos no se manifiestan plenamente y el daño regional es aún limitado (Mosconi, 2005; Jagust et al., 2007). Esta tecnología de neuroimagen funcional incluso puede ayudar a efectuar el diagnóstico de la demencia diferenciándola del envejecimiento normal ya desde su inicio o incluso antes de la aparición de sintomatología (Ishii et al., 1998; Ishii et al., 2007).

La disminución del metabolismo mediante ^{18}F -FDG-PET, se puede apreciar antes que con los sistemas de diagnóstico convencionales con una fiabilidad de hasta el 93% (Phelps, 2000). Por ejemplo se ha observado una reducción en el metabolismo cerebral en las áreas más afectadas en la EA, en pacientes jóvenes asintomáticos que presentan el factor de riesgo ApoE4, cinco años antes de la aparición de los primeros síntomas (Norfray and Provenza, 2004; Reiman et al., 2005).

Una posible explicación a los resultados obtenidos en nuestro estudio, es que la ^{18}F -FDG-PET no es suficientemente sensible para detectar los cambios en la captación de glucosa en el modelo animal Tg2576. Kuntner y col. (2009), tampoco obtuvieron diferencias significativas entre los animales Tg2576 con respecto a los WT a los 14 meses de edad mediante ^{18}F -FDG-PET (Kuntner et al., 2009).

No obstante, Niwa y col. (2002) reportaron hipometabolismo cerebral en ratones Tg2576 de 2-3 meses de edad utilizando el radiotrazador 2- ^{14}C -deoxiglucosa mediante autorradiografía (Niwa et al., 2002), estos autores destacan la mayor sensibilidad del método autorradiográfico para la cuantificación

de la captación de glucosa en ratones. De forma similar, Toyama y col. (2004) también reportaron resultados consistentes en la cuantificación del metabolismo de glucosa utilizando el trazador dual ($[^{18}\text{F}]$ -FDG, 2- $[^{14}\text{C}]$ -DG), mediante autorradiografía bidimensional, en cortes histológicos cerebrales de ratones (Toyama et al., 2004).

En base a los trabajos científicos donde se reporta una mayor sensibilidad en la cuantificación de la captación de glucosa mediante autorradiografía, se decidió evaluar el metabolismo cerebral por autorradiografía utilizando el radiotrazador ^{18}F -FDG en ratones macho TgAPP a las 45 semanas de edad, además se incluyeron tratamientos de 4 semanas para quercetina y rutina. La edad elegida para este experimento se fundamenta en los trabajos realizados por Hsiao y col 1996, quienes desarrollaron el modelo animal. Los mismos autores también, describieron que la deposición de las placas neuríticas y el deterioro cognitivo a nivel comportamental se hace visible a los 9 meses de edad (Hsiao et al., 1996).

2.2. OBTENCIÓN DE IMÁGENES 3D POR AUTORADIOGRAFÍA UTILIZANDO ^{18}F -FDG EN RATONES MACHO DE 45 SEMANAS DE EDAD TRATADOS CON QUERCETINA Y RUTINA

En la Figura 66, se muestra la cuantificación de la actividad metabólica obtenida mediante autorradiografía de ratones de 45 semanas de edad.

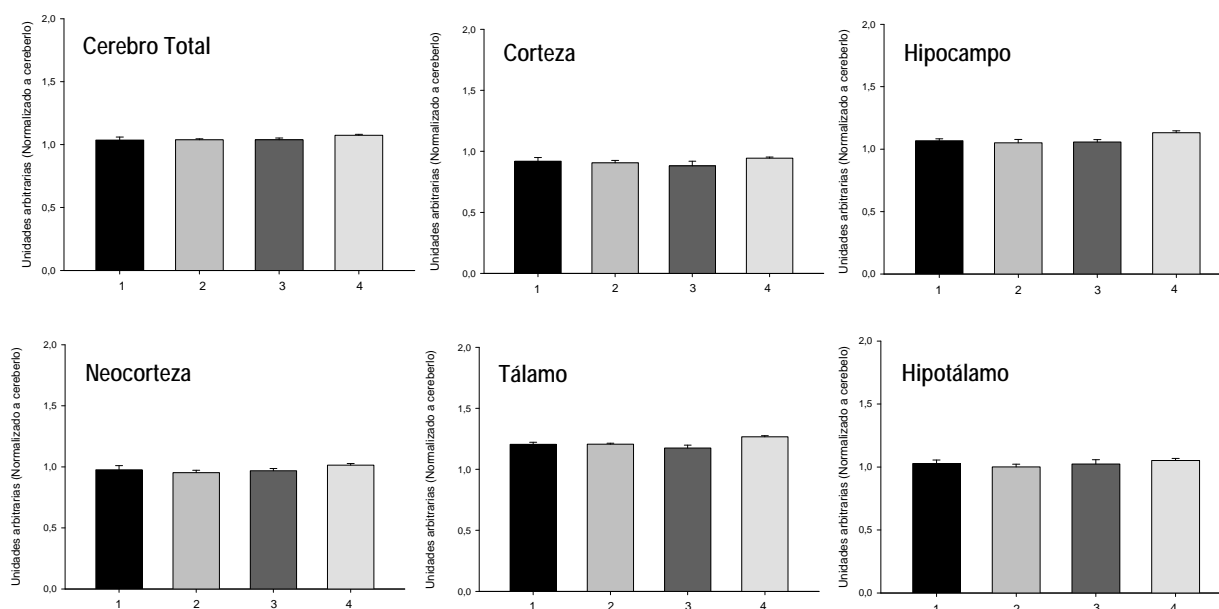


Figura 66. Efectos sobre la captación de glucosa, valorada por autorradiografía utilizando el radiotrazador ^{18}F FDG, comparando ratones WT con ratones TgAPP control y los tratamientos respectivos con quercetina y rutina. 1. WT, 2. TgAPP control, 3. TgAPP + Q4, 4. TgAPP + R4. Los datos muestran la captación de glucosa normalizada respecto a los niveles en cerebelo. Los valores representan las medias \pm SEM.

En la cuantificación de la actividad metabólica en las imágenes obtenidas por técnicas autorradiográficas tampoco se evidenció alteraciones metabólicas significativas en las diferentes estructuras estudiadas entre el grupo de ratones TgAPP control y su correspondiente WT a las 45 semanas de edad.

Del mismo modo, en los tratamientos con los flavonoides quercetina y rutina, tampoco se observó diferencias estadísticamente significativas; sin embargo, en los ratones tratados con rutina se observó un ligero aumento de la actividad metabólica con respecto al grupo TgAPP control, en las diferentes áreas estudiadas.

Uno de los resultados más importantes de este estudio, es que ha permitido poner a punto la reconstrucción tridimensional a partir de cortes autorradiográficos en 2D de cerebro de ratón las imágenes obtenidas se presentan en la Figura 67.

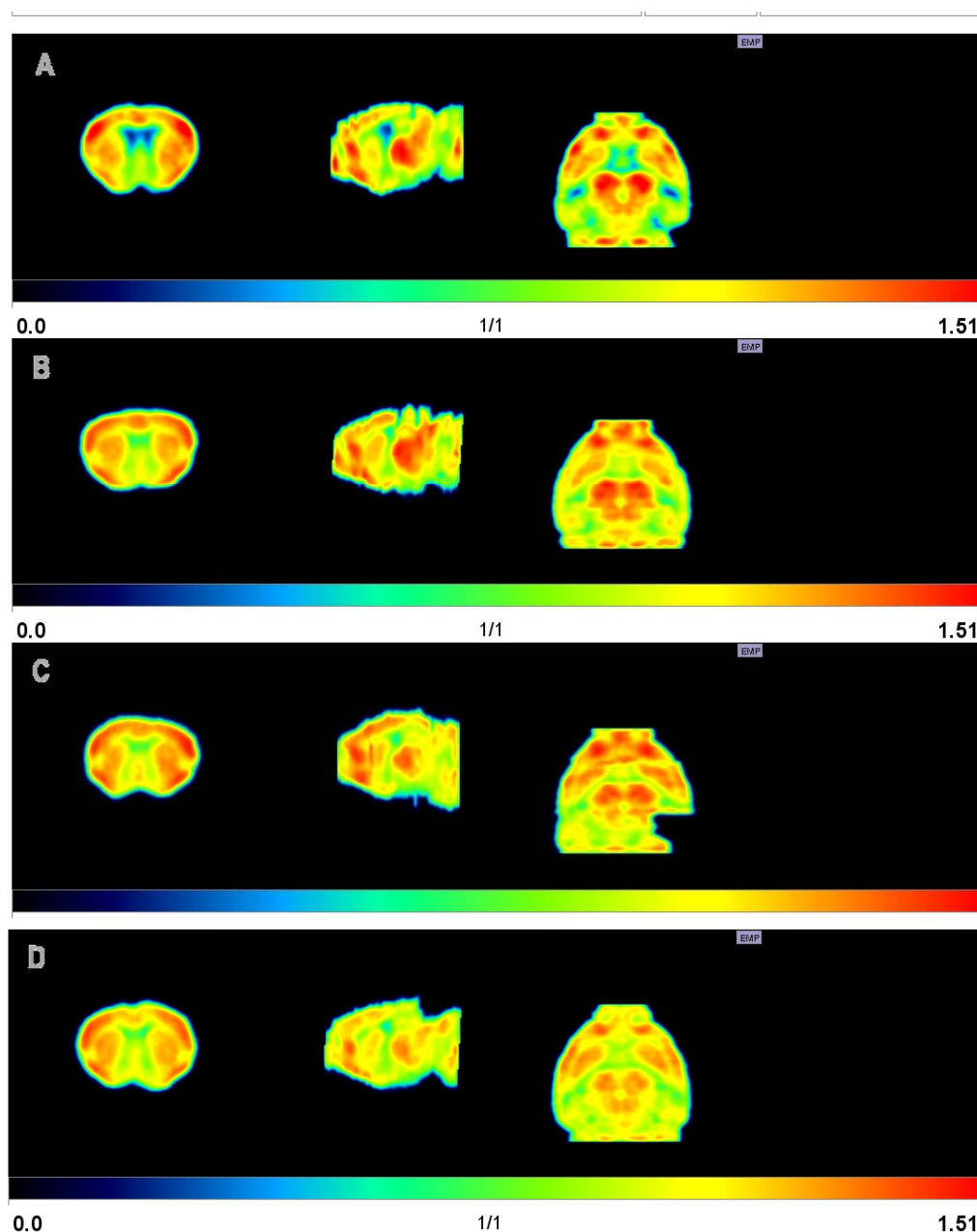


Figura 67. Creación volúmenes 3D a partir de las autorradiografías 2D de cerebro de ratón utilizando el radiotrazador $[^{18}\text{F}]$ -FDG mediante PET en ratones macho de 45 semanas de edad tratados con quercetina y rutina. A. WT, B. TgAPP, C. TgAPP + Q, D. TgAPP + R. Los datos muestran la captación de glucosa normalizada respecto a los niveles en cerebelo y a la actividad inyectada.

Diversos estudios reportan que la cuantificación de la actividad metabólica de glucosa a nivel cerebral podría ser inespecífica en este modelo animal. Luo y col. (2012) usando una combinación de $[^{18}\text{F}]$ -FDG-PET con MRI funcional evaluaron el metabolismo de glucosa de forma global y regional en ratones TgAPP de 7 y 19 meses de edad (Luo et al. 2012). Ellos observaron que los ratones TgAPP de 7 meses de edad presentaban hipermetabolismo de glucosa con respecto a los WT. A los 19 meses observaron que el hipermetabolismo disminuía pero que no difería con respecto a los ratones WT. De ahí que se hace necesaria la búsqueda y el desarrollo de radiotrazadores más específicos, por ejemplo

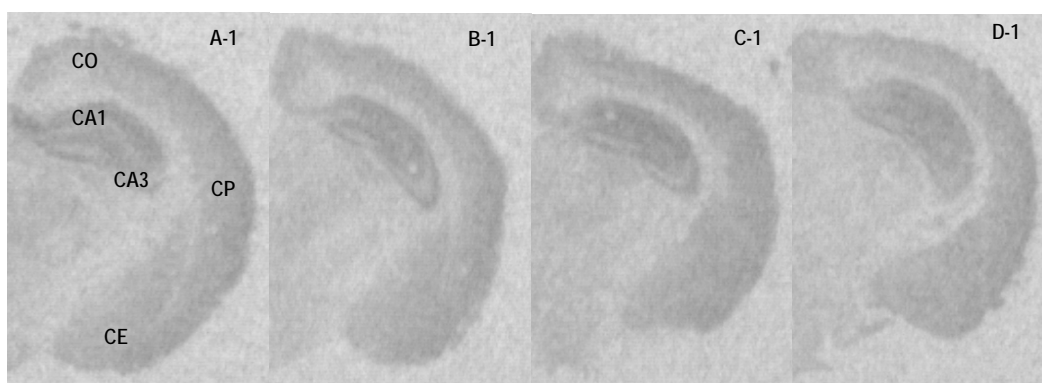
el ^{11}C -PiB es otro ligando que puede emplear la PET, este compuesto se usa para visualizar específicamente βA *in vivo*. Una mayor retención de este ligando se relaciona con la EA (Forsberg et al., 2010). Sin embargo, estas técnicas resultan demasiado costosas para su utilización rutinaria.

2.3. EXPRESIÓN DE RECEPTORES IONOTRÓPICOS DE GLUTAMATO EN RATONES MACHO DE 45 SEMANAS DE EDAD TRATADOS CON QUERCETINA Y RUTINA

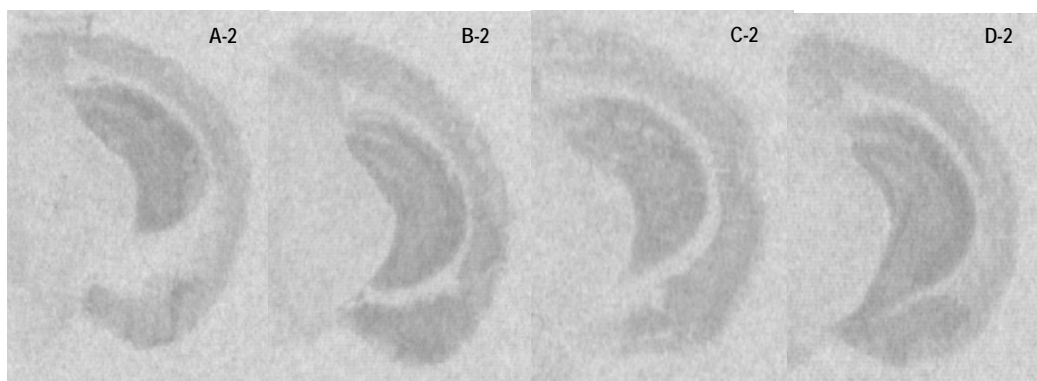
Decidimos evaluar la expresión de los diferentes subtipos de receptores ionotrópicos de glutamato en el modelo transgénico y el efecto de los tratamientos sobre los mismos, mediante autorradiografía utilizando ligandos específicos para cada subtipo de los receptores de glutamato. Se utilizaron los mismos cortes histológicos obtenidos para la determinación *ex vivo* de la actividad metabólica, ya que el radioisótopo ^{18}F -FDG posee un tiempo de vida media aproximado de 2 h. Una vez utilizados, los cortes fueron almacenados -80°C , hasta el momento de la realización del ensayo autorradiográfico.

Para la determinación de la densidad receptorial se eligieron cortes coronales a nivel de la posición Bregma $-2,54$ mm, con la intención de observar tanto diferentes divisiones corticales como el hipocampo. La cuantificación de la expresión de los receptores NMDA y AMPA se llevó a cabo en corteza occipital, parietal y entorrinal, y a nivel de hipocampo CA1 y CA3. En el caso del receptor de kainato que se expresa principalmente a nivel de corteza, solo se realizaron las determinaciones en corteza occipital, parietal y entorrinal (Figura 68).

NMDA



AMPA



KAINATO

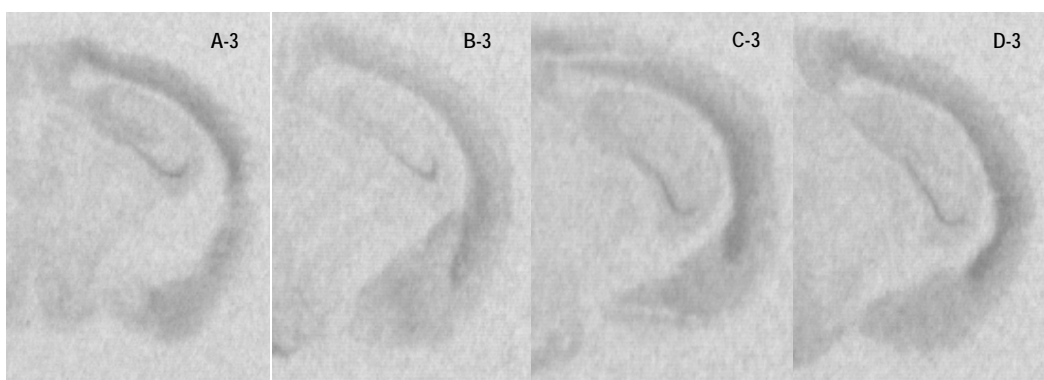


Figura 68. Autorradiogramas representativos de la sección coronal del hemisferio cerebral izquierdo. (A) WT, (B) TgAPP control, (C) TgAPP + Q4, (D) TgAPP + R4. No se observaron cambios significativos entre WT y TgAPP, tampoco entre con los tratamientos. Sección tomada a nivel de Bregma -2,54. (CO) corteza occipital; (CP) Corteza parietal; (CE) corteza entorrinal; (CA1 y CA3) hipocampo.

La cuantificación de los niveles de los receptores ionotrópicos de glutamato se presenta en la Tabla 25.

Tabla 25. Efecto del tratamiento con quercetina y rutina sobre la densidad de los receptores NMDA, AMPA y kainato en corteza occipital, parietal y entorrinal y a nivel de hipocampo CA1 y CA3. WT (n=3), TgAPP control (n=3), TgAPP + Q (n=2) y TgAPP + R (n=2). Los valores representan las medias de los porcentajes con respecto a los ratones TgAPP \pm SEM.

NMDA	WT	TgAPP	TgAPP + Q	Tg + R
Corteza occipital	99,463 \pm 0,234	100,000 \pm 0,329	102,182 \pm 0,393	100,083 \pm 0,538
parietal	101,143 \pm 0,474	99,911 \pm 0,342	103,363 \pm 0,650	100,708 \pm 0,470
entorrinal	101,007 \pm 0,474	100,460 \pm 0,556	103,261 \pm 0,594	100,573 \pm 0,469
Hipocampo CA1	99,962 \pm 0,655	99,883 \pm 0,467	103,762 \pm 0,667	98,597 \pm 1,003
CA3	103,257 \pm 0,624	100,000 \pm 0,428	103,850 \pm 0,929	102,877 \pm 0,738
AMPA				
Corteza occipital	99,244 \pm 0,519	100,000 \pm 0,419	97,016 \pm 0,641*	99,685 \pm 0,311
parietal	99,307 \pm 0,867	100,000 \pm 0,873	98,222 \pm 1,109	99,587 \pm 0,888
entorrinal	100,458 \pm 1,029	100,000 \pm 0,665	101,217 \pm 0,653	100,286 \pm 0,616
Hipocampo CA1	98,664 \pm 0,669	100,000 \pm 0,804	97,297 \pm 1,235	100,907 \pm 0,804
CA3	100,691 \pm 0,520	100,000 \pm 0,572	98,326 \pm 1,148	100,380 \pm 0,570
Kainato				
Corteza occipital	99,463 \pm 0,234	100,000 \pm 0,329	102,182 \pm 0,393	100,083 \pm 0,538
parietal	102,812 \pm 0,685	100,000 \pm 0,930	99,442 \pm 1,077	100,018 \pm 0,865
entorrinal	103,333 \pm 0,769	100,000 \pm 0,459	99,220 \pm 0,756	104,058 \pm 1,162

*p<0,05 frente a TgAPP control. (Test Student-Newman-Keuls).

Los valores fueron expresados como porcentajes en función de los valores obtenidos para los ratones TgAPP control. No se encontraron diferencias significativas, comparando los valores obtenidos para los ratones TgAPP control con respecto a los ratones WT. Posiblemente en esta línea transgénica la sobreexpresión de APP^{swe}, no involucra alteraciones a nivel de la expresión de receptores NMDA, AMPA ni kainato a las 45 semanas de edad. Tampoco se observaron efectos destacables en la expresión de estos receptores ionotrópicos en presencia de los tratamientos de 4 semanas con quercetina ni con rutina.

Un factor común a todas las enfermedades neurodegenerativas es la alteración de uno o más sistemas de neurotransmisión. Dentro de este grupo de sistemas susceptibles de alteración se encuentra el sistema glutamatérgico. El glutamato es el neurotransmisor excitatorio por excelencia, ya que participa en el 70% de las sinapsis excitatorias. Aunque desempeña importantes funciones fisiológicas en el SNC, la activación excesiva de sus receptores, bajo ciertas condiciones es neurotóxica y se ha relacionado con procesos neurodegenerativos, tanto agudos como crónicos (Choi et al., 1988).

Los receptores ionotrópicos de glutamato son canales iónicos selectivamente permeables a distintos cationes, y están a su vez subdivididos en tres grupos diferentes de acuerdo a sus agonistas selectivos: N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA), y kainato (Monaghan et al., 1989). Generalmente se engloban los dos últimos en una categoría común, denominada receptores no-NMDA.

Existen numerosos aspectos comunes entre la neurodegeneración inducida por el péptido β A y la muerte neuronal inducida por el exceso de glutamato. La adición de β A y otros péptidos amiloidogénicos a cultivos primarios de neuronas provoca un aumento lento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, y se ha propuesto que este aumento es el que media la neurotoxicidad (Mattson et al., 1992; Mattson et al., 1995). Además, los altos niveles de Ca^{2+} intracelular podrían ejercer algún efecto sobre el procesamiento proteolítico anormal de la APP, provocando un aumento en la generación del péptido β A, ya que la exposición de células neuronales a agentes que inducen el influjo de Ca^{2+} provocan un aumento en la producción de β A (Lopez et al., 2008).

Diversos estudios demuestran que la excitotoxicidad es producto de la combinación de factores entre los que se incluyen: a) un incremento en las concentraciones de glutamato bien por liberación del mismo desde las aferencias situadas en la corteza o por reducción en la recaptación de glutamato por parte de la glía, b) hipersensibilidad de receptores NMDA postsinápticos, c) alteración en la homeostasis intracelular del Ca^{2+} y d) disfunciones mitocondriales. Por lo tanto, las terapias utilizadas para detener el avance de la enfermedad incluyen diversos inhibidores glutamatérgicos, como la memantina. Aunque algunos estudios revelan que estos agentes tienen efecto tan solo sobre algunos síntomas, más no se tiene una evidencia de que puedan detener la neurodegeneración (Hattori, 2013).

Diversos estudios reportan la capacidad de los flavonoides de inhibir la excitotoxicidad neuronal inducida por glutamato, por ejemplo el flavonol miricetina inhibe dicha toxicidad a través de la protección de las neuronas por diferentes vías. En primer lugar modula el receptor NMDA por fosforilación causando una reducción de la sobrecarga intracelular de Ca^{2+} inducida por glutamato. El segundo mecanismo de neuroprotección sería la capacidad de inhibir la producción de ROS provocada por glutamato. Finalmente, el tratamiento con miricetina reduciría la activación de caspasa 3 inducida por glutamato. Se ha descrito, que miricetina por su estructura polifenólica tiene la capacidad de formar 3 puentes de hidrógeno con el centro activo de caspasa 3 inhibiendo de esta forma la actividad enzimática de la misma (Shimmyo et al., 2008d). Estos resultados sugieren el potencial neuroprotector de los flavonoides sobre la excitotoxicidad inducida por glutamato, específicamente los flavonoles como quercetina y rutina también podrían ejercer dicha actividad, por la similitud estructural que presentan con miricetina. Sin embargo, es necesario estudiar el efecto sobre un modelo más específico, ya que en los ratones TgAPP, en las condiciones ensayadas, no presentaron cambios destacables con respecto a los ratones WT.

2.4. EVALUACIÓN DE LA NEURODEGENERACIÓN (TINCIÓN MARCAJE CON FLUORO-JADE C) Y DE LA MORFOLOGÍA NUCLEAR DE NEURONAS DE HIPOCAMPO (CONTRATINCIÓN CON DAPI)

En base a la teoría de la cascada amiloide, se establece que la acumulación y la agregación del βA , desencadena procesos neurodegenerativos que finalmente conllevan a la muerte neuronal. Para evaluar si realmente la acumulación de βA induce neurodegeneración celular utilizamos el colorante Fluoro-Jade C que tiñe las células en proceso de degeneración celular. En concreto se tiñeron con Fluoro-Jade C secciones coronales a nivel de la posición -2,54 siguiendo el sistema de referencia Bregma. No se observaron signos característicos de neurodegeneración a la edad en que se evaluaron los ratones transgénicos, comparado con los ratones WT, tampoco los tratamientos con quercetina y rutina durante 4 semanas mostraron positividad a este colorante (Figura 69. A-1. B-1, C-1 y D-1).

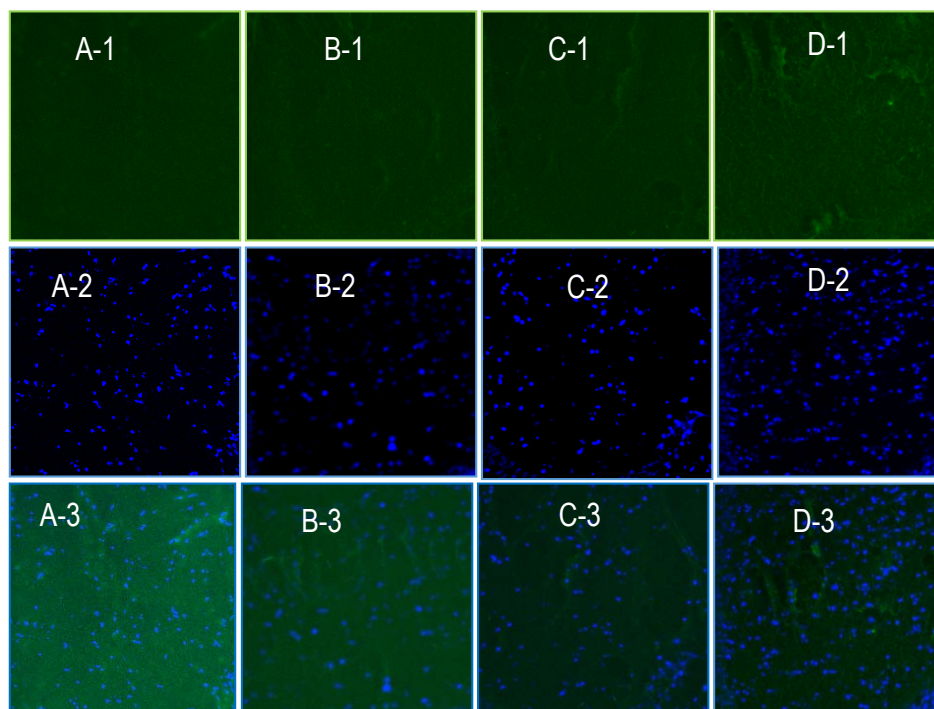


Figura 69. Observación de la neurodegeneración (Fluoro-Jade C) y de la cromatina nuclear (DAPI) a nivel de hipocampo CA3. 1. Fluoro-Jade C, 2. DAPI, 3. Superposición DAPI y Fluoro-Jade C. A. WT, B. Tg control, C. Tg + Q, D. Tg + R.

La contratinción con 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) de las neuronas de hipocampo nos permitió observar la morfología nuclear, ya que este compuesto es un colorante fluorescente para ácidos nucleicos. Como se observa en las imágenes (Figura 69. A-2. B-2, C-2 Y D-2), los núcleos aparecen redondeados y con una tinción clara. Por ende, no hemos observado núcleos fragmentados o con forma lobular, típicamente apoptóticos, tampoco se detectaron diferencias remarcables comparando los cortes histológicos de hipocampo de la línea transgénica control con respecto a los cortes de los WT, ni entre los tratamientos con quercetina y rutina con respecto a los ratones TgAPP control.

Si bien es cierto los modelos transgénicos para la EA desarrollan progresivamente muchas de las principales características de la enfermedad, como elevados niveles de βA , depósitos de amiloide, neuroinflamación, estrés oxidativo, gliosis, pérdida sináptica y déficit cognitivo; sin embargo, ni los ONF ni la muerte neuronal son aparentes en la gran mayoría de los modelos (Balducci and Forloni, 2011). El modelo Tg2576, tampoco es la excepción, ya que a las 45 semanas de edad no se evidenció rasgos característicos de muerte neuronal con la tinción con Fluoro-Jade C.

Cabe señalar que en otros modelos animales si se han reportado muerte neuronal como el ratón APP23 a los 14 meses de edad (Calhoun et al., 1998). La combinación de varias mutaciones de APP y PS1 favorece la aparición de este rasgo patológico, como en el caso del 5xFAD que ha mostrado pérdida

neuronal a nivel de hipocampo en etapas más tempranas (Casas et al., 2004; Oakley et al., 2006). Aunque ninguno de los modelos reproduce totalmente las características de la enfermedad en humanos, estos modelos permiten estudiar muchos de los aspectos relacionados con la EA, así como valorar posibles tratamientos terapéuticos.

2.5. GLUTATION

Con el fin de evaluar parámetros de estrés oxidativo en los ratones TgAPP, se cuantificaron los niveles de GSH y GSSG, y se determinó el cociente GSH/GSSG como marcador del poder reductor celular, tanto en machos como en hembras (Figura 70).

En la evaluación del efecto del transgen en el sistema del glutation, se ha observado un descenso del poder reductor celular (GSH/GSSG) respecto a los animales WT tanto en machos como hembras y en ambas áreas cerebrales. Mientras que en las hembras este descenso es consecuencia de una disminución en los niveles de GSH, en los machos se atribuye a un aumento de los niveles de GSSG (Fig 70).

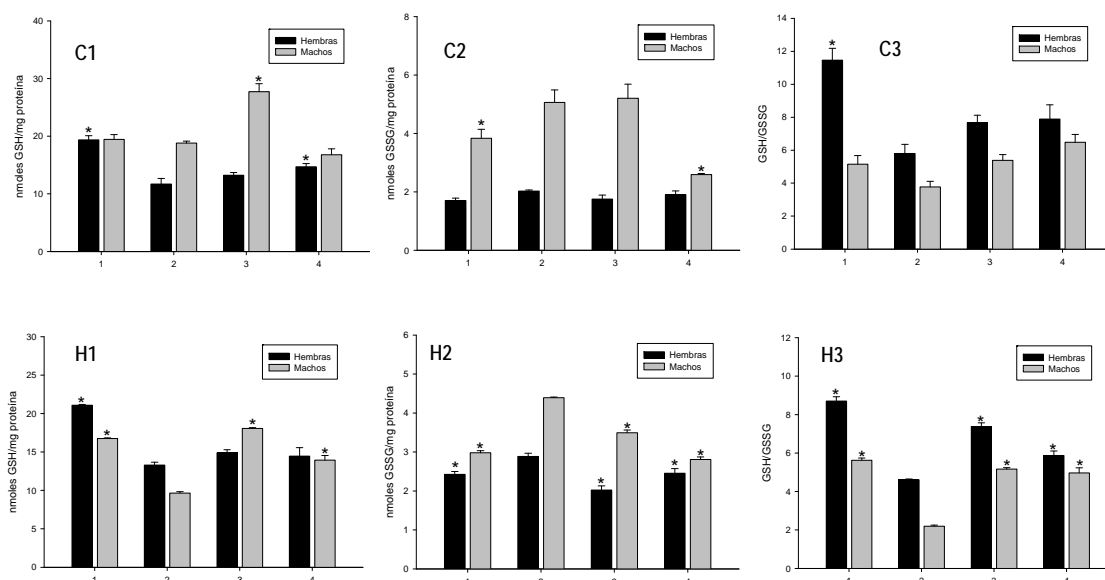


Figura 70. Efecto de quercetina y rutina sobre los niveles de GSH (C1, H1), GSSG (C2, H2) y GSH/GSSG (C3, H3). Corteza (C) e Hipocampo (H) 1. WT, 2. TgAPP control, 3. TgAPP + Q4, 4. TgAPP + R4. * $p < 0,05$ frente a TgAPP control. (Test Student-Newman-Keuls).

En nuestro modelo animal TgAPP hemos encontrado diferencias significativas dependientes del sexo, especialmente en el hipocampo. Los machos presentaron menores niveles de GSH, mayores de GSSG, y como consecuencia un descenso significativo del poder reductor celular (GSH/GSSG) ($p < 0,05$).

Los ratones TgAPP control hembras con respecto a los WT, experimentaron una disminución de GSH en más del 35% ($p < 0,001$), tanto a nivel de corteza cerebral e hipocampo (Fig 70 C1 y H1). Los niveles de GSSG se incrementaron en torno al 19% (Fig 70 C2 y H2) y el poder reductor (GSH/GSSG) se vio significativamente disminuido en más del 45% ($p < 0,05$) (Fig 70 C3 y H3).

Los tratamientos fueron capaces de revertir parcialmente el estrés oxidativo observado en los ratones hembra TgAPP. A nivel de corteza cerebral, rutina incrementó significativamente los niveles de GSH en más de 25% ($p < 0,05$), con respecto a los TgAPP que no recibieron tratamiento (Fig 70 C1), y quercetina fue capaz de disminuir los niveles de GSSG en más de 29% ($p < 0,05$) a nivel de hipocampo

(Fig 70 H2). Tanto quercetina como rutina incrementaron significativamente el cociente GSH/GSSG en más de 60 y 27% ($p<0,05$), respectivamente a nivel de hipocampo. Ambos efectos observados con rutina y quercetina, han sido más acusados en los machos que en las hembras.

En los ratones macho, a nivel de hipocampo los niveles de GSH disminuyeron en más de 42%, los niveles de GSSG se incrementaron en más del 47%, los que se tradujo en una disminución muy marcada del poder reductor celular (GSH/GSSG) mayor al 60%. Por su parte quercetina y rutina; fueron capaces de revertir de forma estadísticamente significativa, este acusado estrés oxidativo, ya que incrementaron los niveles de GSH en 87 y 44%, redujeron los valores de GSSG en 20 y 36% respectivamente, lo que se tradujo en un incremento del poder reductor celular en más 125% en ambos flavonoides ($p<0,05$).

Asimismo, a nivel de corteza cerebral sólo los niveles de GSSG mostraron una disminución estadísticamente significativa ($p<0,05$) de 24% en los ratones TgAPP control respecto a los WT. Mientras que el tratamiento con rutina fue capaz de disminuir en un 49% los niveles de GSSG ($p<0,05$) y a su vez aumentar la tasa de GSH/GSSG en 72% ($p<0,05$), quercetina incrementó los niveles de GSH en 47%.

La disminución en los niveles de GSH representa uno de los marcadores bioquímicos tempranos más importantes en diversas enfermedades neurodegenerativas como la EA (Tsang and Chung, 2009; Cencioni et al., 2013). La relación entre GSH/GSSG disminuye durante la degeneración neuronal, lo cual favorece la formación de radicales libres. Además, se ha descrito que el estrés oxidativo incrementa la producción y agregación del β A y también favorece la hiperfosforilación de tau (Tong et al., 2005). Se considera que existen varios mecanismos promotores de ROS durante la enfermedad; uno de ellos es el incremento de metales como Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} . Las regiones cerebrales que se afectan mayormente en la EA son la amígdala, la corteza y el hipocampo. Esto se relaciona con el incremento del Fe^{3+} en estas regiones. Además, la unión de estos cationes con el β A forma complejos que favorecen la agregación del péptido y la generación de H_2O_2 (Atwood et al., 2003). La presencia de ROS, a su vez, incrementa la expresión y la actividad de BACE y γ -secretasa que participan en el procesamiento de la APP, lo que genera un incremento en la producción de βA_{1-42} , el cual tiene una mayor capacidad de agregación en comparación con βA_{1-40} .

Diversos estudios reportan la propiedad de los flavonoides de inducir la expresión de genes neuroprotectores, incluyendo aquellas enzimas involucradas en la síntesis de GSH, a través de la activación del factor de transcripción Nrf2 (Nuclear Factor Erythroid 2-related factor). Arredondo y col (2010) reportaron que los pre-tratamientos con quercetina aumentaron los niveles totales de GSH y permitieron contrarrestar los efectos tóxicos del H_2O_2 en cultivos celulares (Arredondo et al., 2010). Asimismo, diferentes estudios correlacionan el incremento de GSH que provoca quercetina con la activación del factor de transcripción Nrf2 (Myhrstad et al., 2002; Alia et al., 2006). Esta vía citoprotectora tiene especial interés en relación con el estrés oxidativo y la actividad que ejercen los flavonoides, ya que Nrf2 es responsable de inducir la expresión de una batería de genes que codifican proteínas antioxidantes, y por lo tanto promueven la regulación del potencial redox intracelular (Zhai et al., 2013; Zhang et al., 2013). En este sentido, también se ha descrito que quercetina promueve la expresión de γ -glutamylcisteína sintetasa, una enzima limitante en la síntesis de GSH, cuya transcripción está regulada por la activación de Nrf2 (Arredondo et al., 2010). Las acciones biológicas de los flavonoides se han atribuido a sus propiedades antioxidantes, debidas principalmente a sus capacidades reductoras *per se* o por influenciar el estado de oxidación/reducción (redox) intracelular asociado con la activación del Nrf2.

2.6. SUSTANCIAS REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

Determinamos los niveles de TBARS, como marcador de peroxidación lipídica, y mediante curvas de calibración se expresaron los resultados en concentración de MDA. En la Figura 71, se presentan los resultados obtenidos de la cuantificación de MDA. Tras la sobreexpresión de APP se observó un

incremento de los niveles de MDA en más del 25%, tanto a nivel de corteza cerebral como en hipocampo, en machos y en hembras ($p < 0,05$). En las hembras, este efecto fue revertido con los tratamientos de quercetina y rutina, en más del 27% a nivel de corteza cerebral ($p < 0,05$) y en más del 15% a nivel de hipocampo ($p < 0,05$). En el caso de los machos se observó una disminución significativa con respecto a los TgAPP, en más del 21% a nivel de corteza cerebral y en más del 27% a nivel de hipocampo ($p < 0,05$). Varios estudios han demostrado un aumento de los marcadores de peroxidación lipídica en los cerebros de los pacientes con EA, especialmente a nivel de corteza cerebral e hipocampo (Pratico et al., 2001; Liu et al., 2005; Casado et al., 2008; Reed et al., 2009). Por tanto, es importante la búsqueda de compuestos capaces de inhibir la lipoperoxidación, ya que de esta forma se inhibiría una de las principales vías neurodegenerativas en la EA (Halliwell, 2012).

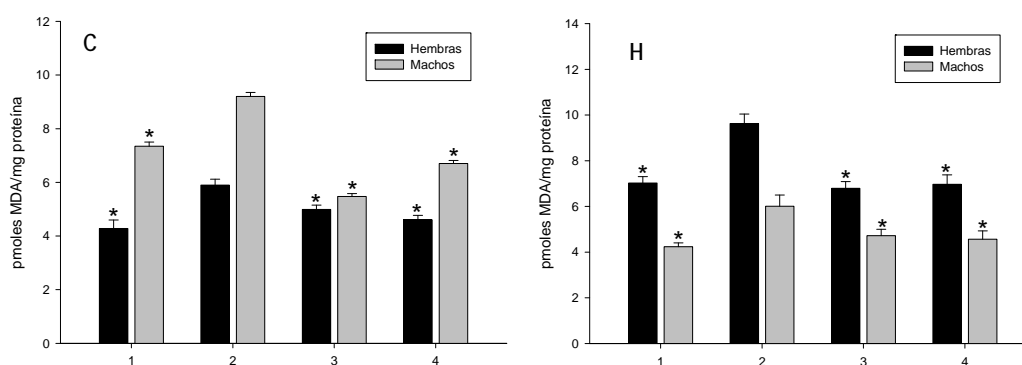


Figura 71. Efecto de quercetina y rutina sobre los niveles de MDA. Corteza (C) e Hipocampo (H) 1. WT, 2. TgAPP control, 3. TgAPP + Q4, 4. TgAPP + R4. * $p < 0,05$ frente a TgAPP control. (Test Student-Newman-Keuls).

De nuestros resultados se concluye que los tratamientos con rutina y quercetina, tanto en machos como en hembras, restablecieron los niveles de MDA a los valores de los animales WT, y evidencian el probable efecto neuroprotector que ejercen rutina y quercetina sobre la peroxidación lipídica asociada a la sobreexpresión de APPswe.

2.7. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y EXPRESIÓN DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

En la figura 72 se presentan las actividades enzimáticas de SOD, CAT, GR y GPx-Se, determinadas en ratones hembra y macho, a nivel de corteza cerebral e hipocampo.

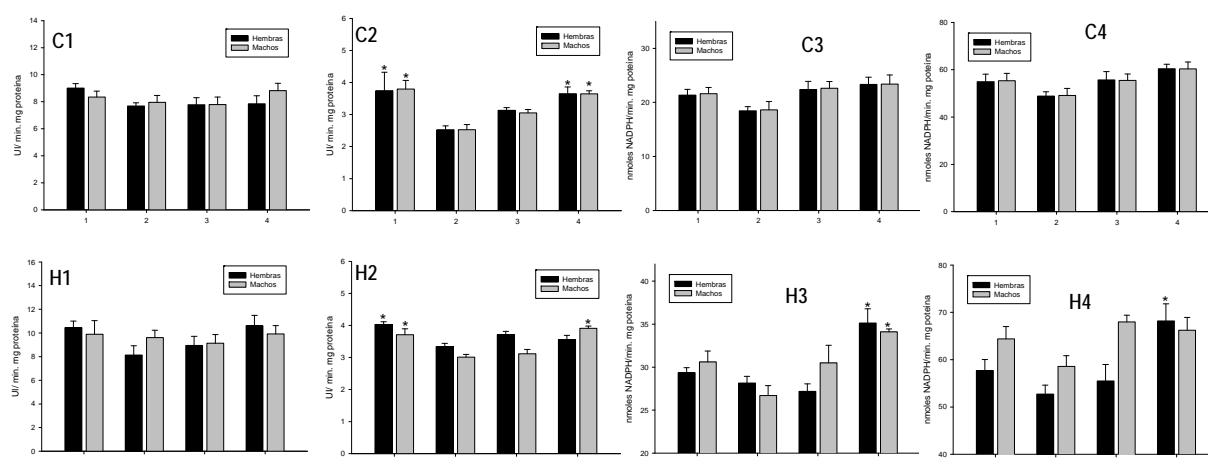


Figura 72. Efecto de quercetina y rutina sobre las actividades enzimáticas de SOD (C1, H1), CAT (C2, H2), GR (C3, H3) y GPx (C4, H4). Corteza (C) e Hipocampo (H) 1. WT, 2. TgAPP control, 3. TgAPP + Q4, 4. TgAPP + R4. * $p < 0,05$ frente a TgAPP control. (Test Student-Newman-Keuls).

Como consecuencia de la sobreexpresión de APP, se observó una disminución generalizada de las actividades enzimáticas en los ratones TgAPP control con respecto a los WT. Sin embargo, esta disminución sólo fue significativa para la actividad enzimática de CAT tanto a nivel de corteza como de hipocampo ($p < 0,05$). En nuestro modelo animal TgAPP no hemos encontrado diferencias significativas dependientes del sexo, ni en corteza ni en hipocampo, en la actividad de las principales enzimas antioxidantes.

El tratamiento con quercetina no produjo ninguna variación significativa de las actividades enzimáticas ni en machos ni en hembras en las áreas cerebrales estudiadas. Los animales tratados con rutina, experimentaron un incremento en la actividad CAT en corteza y de GR en hipocampo, tanto en machos como en hembras ($p < 0,05$).

Para corroborar los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad de las enzimas antioxidantes, cuantificamos la expresión génica de aquellas en las que se produjo alguna variación significativa como consecuencia de los tratamientos. Solamente los animales tratados con rutina experimentaron cambios en la actividad enzimática de CAT y GR en corteza e hipocampo tanto en machos como en hembras, y GPx en hipocampo de ratones hembra (Fig 72). Los resultados de expresión génica de dichas enzimas aparecen en las Figuras 73 y 74.

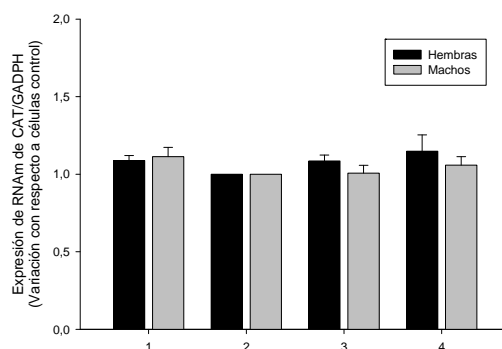


Figura 73. Efecto de quercetina y rutina sobre la expresión de CAT en corteza. 1. WT, 2. TgAPP control, 3. TgAPP + Q4, 4. TgAPP + R4. * $p < 0,05$ frente a TgAPP control. (Test Student-Newman-Keuls).

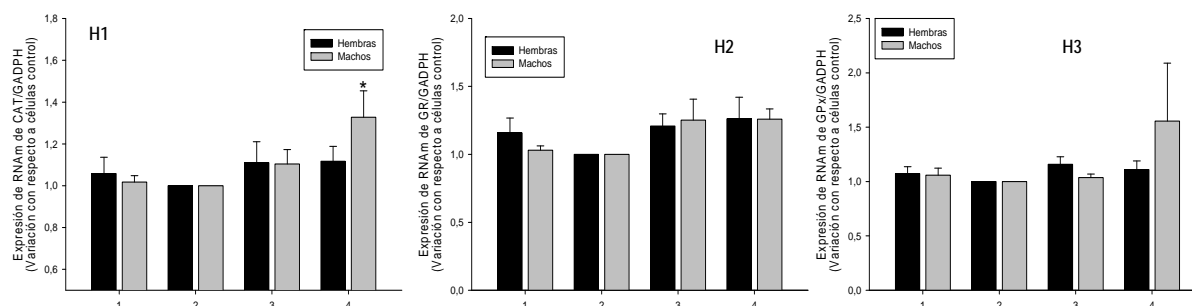


Figura 74. Efecto de quercetina y rutina sobre la expresión de CAT (H1), GR (H2) y GPx (H3) en hipocampo. 1. WT, 2. TgAPP control; 3. TgAPP + Q4; 4. TgAPP + R4. * $p < 0,05$ frente a TgAPP control. (Test Student-Newman-Keuls).

Mientras que en corteza cerebral no se han observado cambios en la expresión de CAT tras el tratamiento con rutina, en hipocampo de ratones macho se produjo un incremento significativo del 32% ($p < 0,05$). En cuanto a GPx, se observó un patrón similar al de CAT aunque el incremento observado no llegó a ser significativo. El incremento observado en la actividad de GR en hipocampo, tanto en machos como en hembras, se corrobora en cierta medida con incremento de un 25% aunque no es estadísticamente significativo.

El estrés oxidativo promueve la alteración estructural y funcional de las macromoléculas orgánicas, llevando a las células afectadas a procesos disfuncionales y a la muerte por necrosis o apoptosis (Halliwell, 2012). Se ha reportado que en patologías neurodegenerativas como la EA el sistema defensivo antioxidante constituido por las enzimas SOD; CAT; GR y GPx se encuentra marcadamente disminuido, razón por la cual las neuronas no pueden hacer frente al estrés oxidativo que se desencadena durante el desarrollo de la enfermedad (Halliwell, 2012).

En el modelo animal TgAPP, en mayor o menor grado, se ha encontrado una disminución de la actividad enzimática de SOD, CAT, GR y GPx, con respecto a los ratones WT. Sin embargo, en los pacientes con la EA, se han encontrado resultados contradictorios en los niveles de actividad enzimática en sangre. Algunos estudios han encontrado aumentada la actividad SOD en sangre de pacientes con EA (Ozcankaya and Delibas, 2002; Rossi et al., 2002; Kharrazi et al., 2008). Esto también se ha demostrado que ocurre en cerebro de modelos animales transgénicos que reproducen un estadio temprano de la EA (Resende et al., 2008). Otros estudios han encontrado una disminución de la actividad SOD en pacientes con EA (Rinaldi et al., 2003; Casado et al., 2008; Padurariu et al., 2010; Vural et al., 2010), mientras que Bourdel-Marchasson (2001) no encontró diferencias de actividad en sangre entre pacientes con EA y controles (Bourdel-Marchasson et al., 2001).

También, se han encontrado resultados contradictorios en los niveles de actividad de GPx en sangre de pacientes con EA. Martín-Aragón y col. (2009), reportaron un aumento de la actividad de GPx en plasma de pacientes con EA y otros lo ha corroborado en un modelo *in vivo* de ratones transgénicos con la enfermedad (Resende et al., 2008). Sin embargo, otros autores han encontrado una disminución de la actividad de GPx en los pacientes con EA (Rinaldi et al., 2003; Casado et al., 2008; Kharrazi et al., 2008; Padurariu et al., 2010; Vural et al., 2010); mientras que en otros estudios no se han encontrado diferencias de actividad entre pacientes y controles (Bourdel-Marchasson et al., 2001).

Asimismo, para el caso de la actividad enzimática de GR, algunos autores han encontrado aumentada la actividad en sangre de pacientes con EA (Lovell et al., 1995), mientras que otros no han encontrado diferencias entre grupos (Padurariu et al., 2010) o bien han encontrado disminuida su actividad en plasma de pacientes con EA frente a un grupo control (Casado et al., 2008).

Por tanto, es necesario profundizar en el estudio de estos marcadores de estrés oxidativo para determinar la implicación que tienen en la EA.

2.8. PROCESAMIENTO DE APP

Los resultados de actividad enzimática BACE, tanto en corteza cerebral como en hipocampo, en machos y en hembras se muestran en la Figura 75, expresados como porcentajes de actividad con respecto a los ratones TgAPP control.

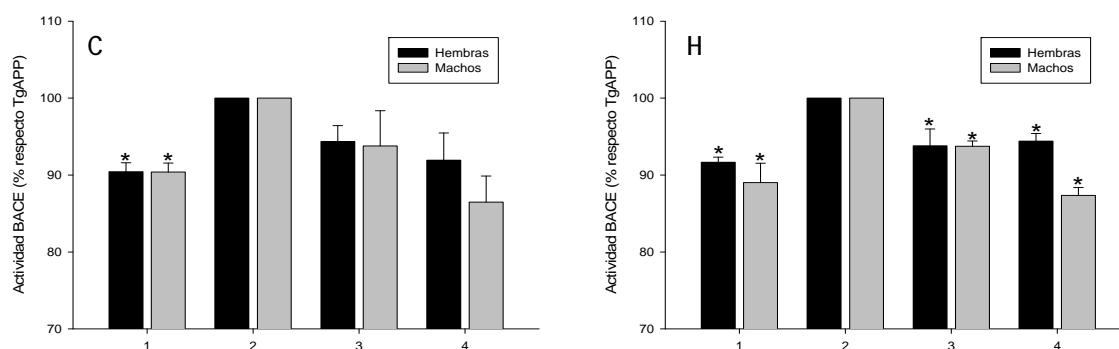


Figura 75. Efecto de quercetina y rutina sobre la actividad BACE en corteza (C) e hipocampo (H). 1. WT, 2. TgAPP control, 3. TgAPP + Q4, 4. TgAPP + R4. * $p < 0,05$ frente a TgAPP control. (Test Student-Newman-Keuls).

A la vista de los resultados de la Figura 75, se observó un incremento en la actividad enzimática de un 10% con respecto a los ratones WT, en ambas áreas cerebrales en estudio y en ambos sexos, de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$). El incremento observado en la línea transgénica fue revertido con los tratamientos con quercetina y rutina tanto a nivel de corteza cerebral como a nivel de hipocampo y para ambos sexos. Se puede observar que el efecto de rutina fue ligeramente superior con respecto al tratamiento con quercetina en ratones macho.

Una vez realizado el estudio de la actividad enzimática BACE, nos propusimos llevar a cabo un estudio de expresión génica tanto de APP como de sus principales enzimas de procesamiento: BACE y ADAM10. En la Figura 76 se presentan los resultados obtenidos para los tratamientos en ratones hembras y machos, tanto en corteza como en hipocampo.

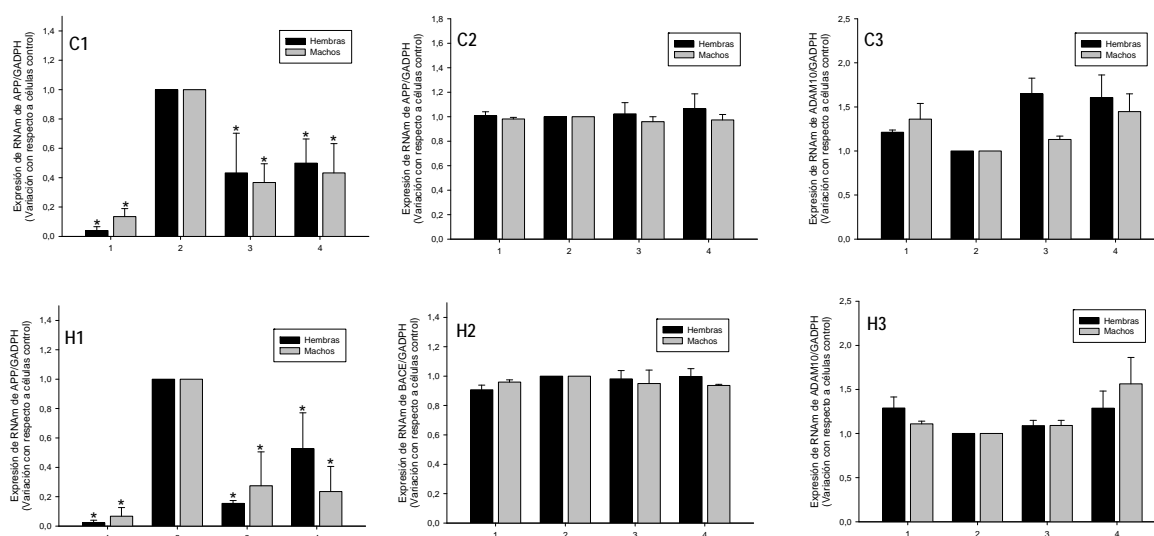


Figura 76. Efecto de quercetina y rutina sobre la expresión de APP (C1, H1), BACE (C2, H2) y ADAM10 (C3, H3). Corteza (C) e Hipocampo (H) 1. WT, 2. TgAPP control, 3. TgAPP + Q4, 4. TgAPP + R4. * $p < 0,05$ frente a TgAPP control. (Test Student-Newman-Keuls).

En ambos sexos se observó un incremento significativo de la expresión de APP en más del 85%, con respecto a los ratones WT, evidenciando la sobreexpresión del gen, tanto a nivel de corteza cerebral como a nivel de hipocampo ($p < 0,05$).

Los tratamientos con quercetina y rutina fueron capaces de disminuir dicha expresión, en más del 45% ($p < 0,05$) para ratones hembra y macho, en ambas áreas cerebrales en estudio. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por Augustin y col (2009) quienes testaron un extracto estandarizado de *Ginkgo biloba* (EGb761), rico en flavonoles como la quercetina. Estos autores estudiaron el efecto de EGb761 sobre los niveles de APP en ratones hembras TgAPP de 4 meses de edad, observando una disminución significativa de los niveles de APP de aproximadamente 50% con respecto a los ratones WT de la misma edad en corteza cerebral. Los autores relacionan el efecto neuroprotector que ejerce el extracto EGb761 con el descenso en los niveles de APP para este modelo experimental (Augustin et al., 2009).

Tras conocer el efecto de los tratamientos en la actividad enzimática BACE, nos interesó evaluar su expresión, ya que es la primera enzima que interviene en la ruta de procesamiento amiloidogénico de APP. No se encontraron diferencias significativas entre los ratones TgAPP con respecto a los ratones WT y tampoco se observaron cambios destacables con los tratamientos de quercetina y rutina (Fig 76). Por tanto, el aumento en la actividad enzimática BACE no se asocia a un aumento en la expresión.

Nos centramos en la expresión génica de ADAM10, porque es la isoforma constitutiva fisiológicamente más importante de α -secretasa. A pesar de que los cambios no fueron estadísticamente significativos, se observó una ligera disminución de la expresión de ADAM10 en los ratones TgAPP con respecto a los WT. Principalmente el tratamiento con rutina, mostró una tendencia a incrementar la expresión génica de ADAM10 en ambas áreas cerebrales en estudio.

El flavonol miricetina, además de las propiedades antioxidantes, posee un importante efecto neuroprotector frente a la neurotoxicidad inducida por el βA_{1-42} en cultivo primario de neuronas corticales de rata. La exposición de las células corticales al βA_{1-42} generó apoptosis, fragmentación nuclear y activación de caspasa 3, efectos que fueron revertidos con los tratamientos con miricetina de forma concentración-dependiente. También, observaron una disminución de los niveles de βA_{1-42} y βA_{1-40} . Estos hallazgos se correlacionaron con la activación de ADAM10 y la inhibición de BACE, evidenciando las múltiples funciones que podría ejercer miricetina en el progreso de la EA por inhibición de la ruta amiloidogénica de APP (Shimmyo et al., 2008c). Se destacan estos estudios, ya que miricetina es un flavonol que posee similitud estructural con quercetina y rutina.

Por otro lado, se ha descrito que el polifenol del té verde (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG), disminuyó los niveles de βA a nivel cerebral, como resultado de la mitigación de la amiloidosis cerebral en un modelo animal de EA. EGCG aparentemente moduló el procesamiento de APP a través de la vía no amiloidogénica, interrumpiendo la síntesis del péptido βA por activación de la lisis de APP por la enzima α -secretasa. Sin embargo, no observaron alteraciones significativas en la actividad BACE y γ -secretasa (Obregon et al., 2006).

2.10. EXPRESIÓN DE CASPASAS 3 Y 6

El efecto de los tratamientos con quercetina y rutina sobre la expresión génica de las caspasas 3 y 6 en los ratones TgAPP se presentan en la Figura 77.

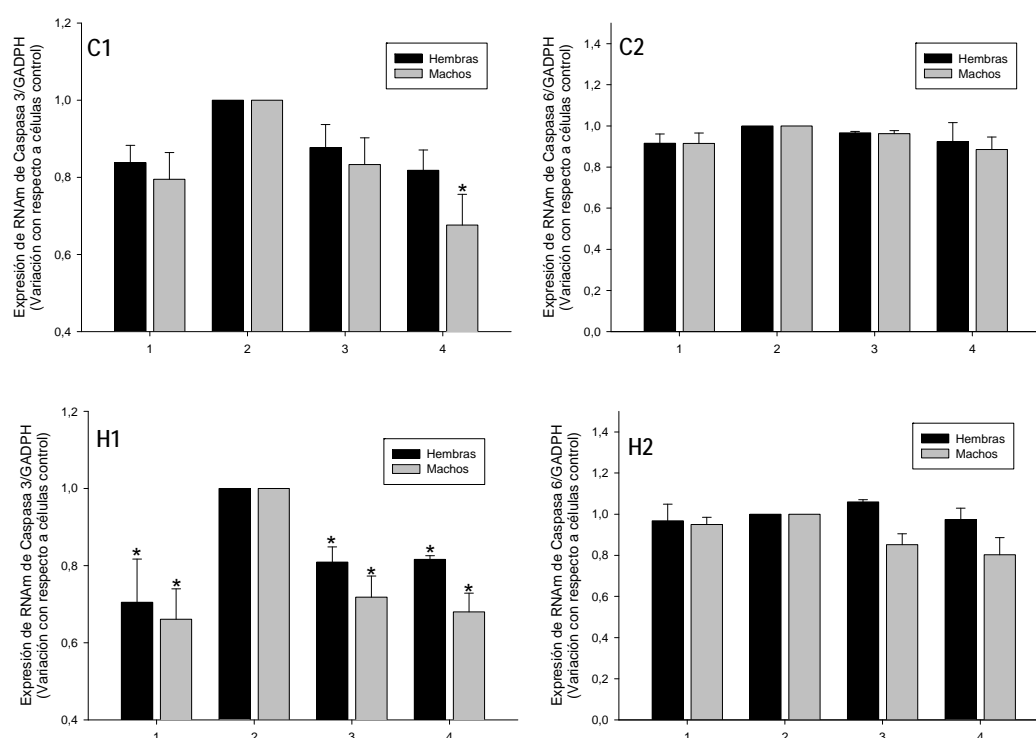


Figura 77. Efecto de quercetina y rutina sobre la expresión de Caspasa 3 (C1, H1) y Caspasa 6 (C2, H2). Corteza (C) e Hipocampo (H) 1. WT, 2. TgAPP control, 3. TgAPP + Q4, 4. TgAPP + R4. *p<0,05 frente a TgAPP control. (Test Student-Newman-Keuls).

Los ratones TgAPP mostraron un incremento significativo de la expresión génica de caspasa 3 en más del 30%, comparado con los ratones WT ($p < 0,05$), mientras que en el caso de caspasa 6 no se apreciaron modificaciones en su expresión.

Los tratamientos con quercetina y rutina fueron capaces de disminuir los niveles de ARNm de caspasa 3 en hipocampo de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$), con porcentajes de inhibición de 17 y 27% para los ratones hembra y macho respectivamente. A nivel de corteza cerebral solo se observaron diferencias significativas en el tratamiento con rutina en machos, con un porcentaje de inhibición de 32% ($p < 0,05$). Mientras que en el caso de la caspasa 6, los tratamientos con quercetina y rutina no ejercieron ningún efecto estadísticamente significativo.

Nuestros resultados respecto a los niveles de caspasa 3 como consecuencia de la transgénesis, están en concordancia con los obtenidos por otros autores, quienes reportaron un incremento en la actividad de caspasa 3 a nivel de las espinas dendríticas en el hipocampo de ratones TgAPP (D'Amelio et al., 2010).

Entre los factores etiológicos de la EA precoz, se han identificado diversas mutaciones que afectan principalmente a cuatro proteínas: APP, PS-1, PS-2 y apolipoproteína E. La secuenciación de las mismas reveló que tres de ellas contienen sitios de corte para la enzima proteolítica caspasa 3, siendo APP la que juega un papel preponderante en la vía amiloidogénica. APP contiene en su secuencia aminoacídica tres sitios de corte distintos para caspasa 3, dos de los cuales se ubican a nivel del dominio extracelular y uno en la porción intracelular C-terminal de la cola de APP (Gervais et al., 1999).

Varios estudios han mostrado que la hidrólisis de APP por caspasa 3 altera el procesamiento proteolítico de APP, en favor de la ruta amiloidogénica. Esto podría ocurrir por disociación de dominios de interacción clave para proteínas a nivel de la secuencia C-terminal de la cola de APP (Borg et al., 1998) o por producción de un segundo péptido no relacionado con la porción C-terminal, el fragmento C-31, un inductor potente de apoptosis (Dumanchin-Njock et al., 2001). Estos hallazgos sugieren que caspasa 3 podría mediar la amplificación de la liberación de fragmentos tóxicos a partir de APP promoviendo la ruta amiloidogénica. En la Figura 78, se presenta la hipótesis de la toxicidad generada por caspasa 3.

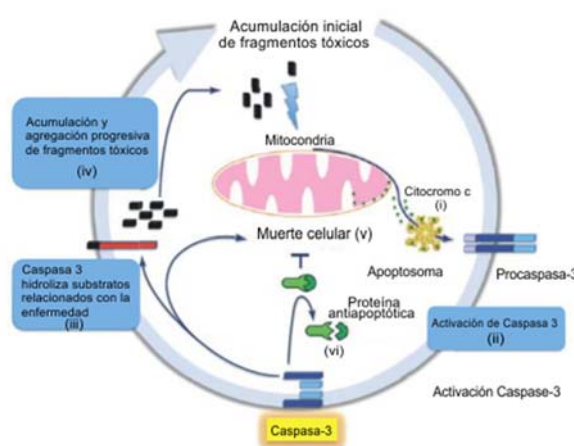


Figura 78. Hipótesis de la toxicidad generada por caspasa 3

De acuerdo a esta hipótesis originalmente propuesta Wellington y Hayden (Wellington and Hayden, 1997), bien por causas genéticas o esporádicas, se podría alterar la función mitocondrial (i) provocando la liberación de citocromo c al citoplasma y la formación del apoptosoma, (ii) provocando la activación de caspasa 3 (Galluzzi et al., 2009; Naoi et al., 2009; Higgins et al., 2010), (iii) La caspasa 3 activada podría hidrolizar sustratos incluyendo APP (Gervais et al., 1999), y las presenilinas (Kim et al., 1997; Loetscher et al., 1997), (iv) La acumulación de fragmentos tóxicos generados por caspasa 3 provocarían alteración de la función mitocondrial y activación de otras caspasas (v) lo que desembocaría finalmente en la muerte

neuronal; (vi) alternatively, podría desactivar funciones antiapoptóticas como la actividad de presenilina, contribuyendo a la amplificación de la muerte neuronal, mediante la eliminación de mecanismos inhibitorios (Walter et al., 1998; Walter et al., 1999).

La caspasa 3 activada por la calcineurina, defosforila la subunidad GluR1 de receptores tipo AMPA a nivel postsináptico. Estas modificaciones moleculares alteran la transmisión sináptica glutamatérgica y la plasticidad neuronal, lo cual se correlaciona con la degeneración y el deterioro cognitivo a nivel de las espinas dendríticas en el hipocampo. La inhibición específica de caspasa 3 por el inhibidor z-DEVD-fmk previene el proceso neurodegenerativo en los ratones TgAPP, sugiriendo que la caspasa 3 contribuye a la disfunción cognitiva en este modelo animal y posiblemente en la EA. Por tanto, la búsqueda de inhibidores de caspasa 3 podría constituir una potencial diana farmacoterapéutica, especialmente durante las etapas iniciales de la enfermedad (D'Amelio et al., 2010).

2.10. MARCADORES DE INFLAMACIÓN

En los pacientes que presentan EA se ha observado un incremento marcado de los mediadores neuroinflamatorios, principalmente alrededor de las placas seniles (Niu et al.; Morihara et al., 2005; Albrecht et al., 2009). En este sentido, decidimos cuantificar los niveles de IL-1 β , IFN- γ y TNF- α en el modelo animal en estudio y el efecto de quercetina y rutina sobre los mismos.

Los resultados obtenidos en la expresión génica de IL-1 β , TNF- α e IFN- γ se muestran en la Figura 79.

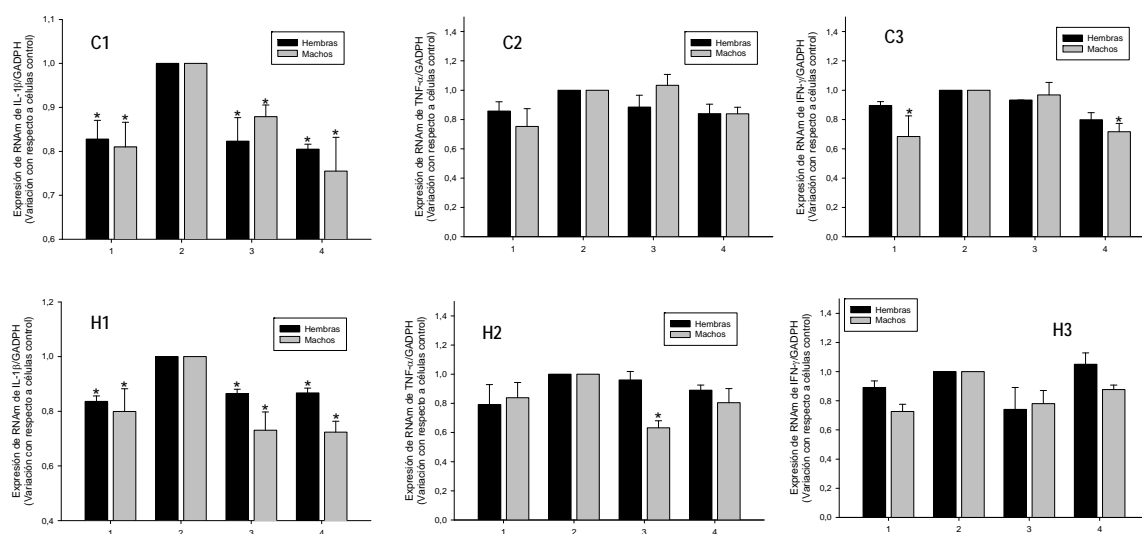


Figura 79. Efecto de quercetina y rutina sobre la expresión de IL-1 β (C1, H1), TNF- α (C2, H2) y IFN- γ (C3, H3). Corteza (C) e Hipocampo (H) 1. WT, 2. TgAPP control, 3. TgAPP + Q4, 4. TgAPP + R4. *p < 0,05 frente a TgAPP control. (Test Student-Newman-Keuls).

En el modelo animal en estudio, se evidenció un incremento significativo en la expresión génica de IL-1 β en más del 20% a nivel de corteza e hipocampo y en ambos sexos, con respecto a los ratones WT ($p < 0,05$). En el caso del IFN- γ , se obtuvo un incremento significativo del 46% en su expresión en corteza cerebral de ratones macho ($p < 0,05$).

El tratamiento con quercetina y rutina, tanto en hembras como en machos, fue capaz de disminuir la expresión de IL-1 β , a nivel de corteza cerebral e hipocampo en más del 13% con respecto a los ratones TgAPP control ($p < 0,05$), obteniéndose valores similares a los de los ratones WT. Además, en el caso de los machos, se produce un descenso significativo en hipocampo de TNF- α para el tratamiento con quercetina y de IFN- γ en corteza cerebral para el tratamiento con rutina ($p < 0,05$).

La asociación de la neuroinflamación con la EA está avalada por estudios neuropatológicos y epidemiológicos. Sin embargo, sigue siendo una incógnita si la inflamación es causa o consecuencia del proceso neurodegenerativo. La inflamación favorece el procesamiento defectuoso de péptido β A y de la APP, promoviendo la agregación del péptido β A y a su vez modificando la reactividad al β A (Hensley, 2010).

En principio, la actividad protectora de los flavonoides frente a la neurodegeneración se asociaba directamente al efecto antioxidante (Rice-Evans et al., 1996). Sin embargo, diversos estudios sugieren que el mecanismo de acción de los flavonoides a nivel cerebral va mucho más allá del efecto antioxidante. Se ha observado que éstos tienen la capacidad de proteger a neuronas vulnerables, estimular el funcionamiento correcto de las neuronas, e incluso favorecer la regeneración e inducir neurogénesis (Spencer, 2009a, 2010). Diversos estudios reportan la acción neuroprotectora de los flavonoides (a concentraciones fisiológicas bajas), ya que estos compuestos polifenólicos tienen la capacidad de interactuar con cascadas de señalización intracelular neuronal/glial, frente a la exposición con neurotoxinas (Levites et al., 2001). Poseen actividad quelante de iones metálicos de transición como el hierro (Mandel et al., 2006) e interfieren con la liberación de mediadores inflamatorios (Spencer, 2009b).

La activación prolongada de la microglía puede conducir a la producción excesiva de diversos factores que contribuyen a la lesión neuronal, fundamentalmente la liberación de NO, citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ), ROS y glutamato. Los niveles excesivos de NO, se producen por activación de la expresión de la iNOS. El NO inhibe selectivamente la respiración mitocondrial a nivel de la citocromo c oxidasa (complejo IV), favoreciendo la interrupción de la síntesis de ATP neuronal y un aumento de la generación de ROS. Además, la producción excesiva de NO induce modificaciones en la estructura de proteínas por nitración y/o S-nitrosilación. También, se ha descrito que la iNOS, activa la NADPH oxidasa que media tanto la producción de radicales superóxido y la liberación de moléculas pro-inflamatorias como el TNF- α . El superóxido generado por la NADPH oxidasa, favorece la expresión de iNOS y la reacción del superóxido con NO forma el ONOO $^-$, altamente neurotóxico, ya que se ha observado que inhibe la respiración mitocondrial, induce la activación de caspasas y la liberación de glutamato favoreciendo la muerte neuronal por excitotoxicidad (Spencer et al., 2012).

En nuestro estudio, se observó que los ratones TgAPP presentaban niveles de ARNm aumentados de los mediadores pro-inflamatorios IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , con respecto a los ratones WT, evidenciando que la sobreexpresión de APP^{swe}, podría estar induciendo cascadas de neuroinflamación desencadenando una serie de vías moleculares en la glía y en las neuronas, que activarían la respuesta inflamatoria. Quercetina y rutina fueron capaces de inhibir la expresión génica de IL-1 β tanto en machos como en hembras y en las áreas cerebrales estudiadas.

Se han encontrado diversas evidencias que apoyan el efecto antiinflamatorio que ejercen los flavonoides a nivel del SNC. Se ha descrito que podrían influir directamente inhibiendo la activación de factores de transcripción como NF- κ B, implicado en la inducción de iNOS, el cual es un factor determinante en la respuesta inflamatoria y por ende disminuir la liberación de mediadores como IL-1 β , TNF- α , IFN- γ (Chen et al., 2005b).

En la Figura 80 se representa el posible mecanismo de acción de los flavonoides relacionando la activación de caspasa 3, la peroxidación lipídica y la respuesta inflamatoria.

El aumento en la producción de citocinas como IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , la iNOS y el NO en las células gliales contribuyen de forma importante al proceso de la neurodegeneración. La inhibición de la sobre-activación de las MAPK, que regulan los eventos de transcripción de las NOS, IL-1 β y el TNF- α en células de la microglía y astrocitos evitaría la respuesta neuroinflamatoria.

Estudios en cultivos celulares estimulados con el lipopolisacárido (LPS) muestran que la administración de quercetina, catequina y EGCG bloquean la respuesta inflamatoria al inhibir la iNOS y COX-2, así como la producción de NO, la liberación de citocinas pro-inflamatorias, y la generación de

ROS, en astrocitos y microglía. Estos compuestos también han demostrado ser capaces de inhibir a las MAPK como la p38 o ERK1/2, las cuales regulan la iNOS y el TNF- α , además de la activación de las células gliales (Kozuka et al., 2005).

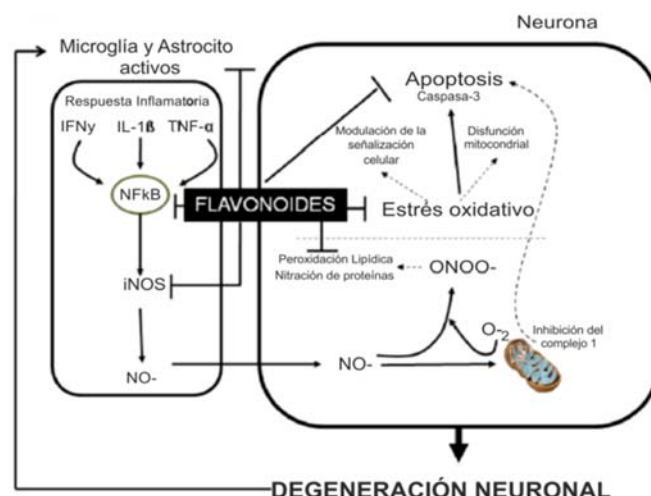


Figura 80. Mecanismo antioxidante y antiinflamatorio de los flavonoides en el SNC. Los mecanismos neuroprotectores de los flavonoides implican la capacidad de interactuar con la señalización neuronal y su potencial para inhibir los procesos de estrés oxidativo e inflamación en el cerebro que conducen a la degeneración neuronal. IFN γ : interferón gamma. IL1 β : interleucina 1 beta. TNF α : factor de necrosis tumoral alfa. NF κ B: factor nuclear kappa B. iNOS: óxido nítrico sintasa inducible. NO: óxido nítrico. O $_2^{\cdot-}$: ion superóxido. ONOO $^-$: peroxinitrito.

Curiosamente, los flavonoides tienen una estrecha homología estructural con inhibidores específicos de cascadas de señalización celular como el PD98059, un inhibidor de MAPK y el LY294002, un inhibidor de la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K). Se ha reportado que PD98059, tiene la capacidad de bloquear de manera efectiva la expresión de iNOS y la producción de NO en células gliales activadas (Bhat et al., 1998). Estos hallazgos sugieren, por similitud estructural, que los flavonoides también podrían ejercer tal actividad antiinflamatoria. Precisamente, el compuesto LY294002 inhibidor de PI3K se diseñó tomando como base la estructura de quercetina. Ambos compuestos encajan en el bolsillo de unión a ATP de la enzima PI3K, ejerciendo de esta forma el mecanismo inhibidor (Vlahos et al., 1994). La capacidad de diversos flavonoides de modular la actividad de PI3K está relacionada con el número de sustituciones de grupos hidroxilo en el anillo B y el grado de insaturación del enlace C2-C3 en el anillo C. Tanto quercetina como rutina contienen en su estructura dichos grupos funcionales. Dichas características estructurales son necesarias para la actividad antiinflamatoria y son importantes para la actividad antioxidante y antiamiloidogénica. Por tanto, los flavonoides quercetina y rutina pueden ser considerados como buenos candidatos como fármacos multidiana para el tratamiento de la EA. En la Tabla 26, se presentan los principales trabajos que apoyan la capacidad antiinflamatoria de los flavonoides quercetina, rutina *In vitro* e *in vivo* (Spencer et al., 2012).

En nuestro modelo TgAPP, se observaron niveles elevados de marcadores inflamatorios. Tanto quercetina como rutina, fueron capaces de inhibir la expresión génica de estos mediadores inflamatorios, además se ha observado que inhiben la activación de caspasa 3, poseen actividad antioxidante y antiamiloidogénica, por tanto, constituyen compuestos potencialmente activos para la prevención de la EA.

Tabla 26. Efecto de los flavonoles quercetina y rutina sobre procesos neuroinflamatorios.

Flavonoide	Efecto biológico	Modelo	Referencia
Quercetina	Reduce iNOS, NO, TNF- α . Inhibe IKK, NF- κ B, AP-1 y STAT-1. Incrementa Hemo oxigenasa-1.	<i>In vitro</i> (BV-2 microglía)	(Chen et al., 2005b)
	Reduce iNOS y NO. Inhibe ERK, JNK, p38, Akt, Src, Janus quinasa-1, Tyk2, STAT-1 y NF- κ B. Inhibe la liberación de radicales libres y serina/treonina y tirosina fosfatasa. Altera la acumulación de lípidos.	<i>In vitro</i> (BV-2 microglía)	(Kao et al., 2010)
	Inhibe TNF- α , IL-1 α . Inhibe la muerte neuronal.	<i>In vitro</i> (N9 microglía)	(Bureau et al., 2008)
	Reduce ROS. Estimula la síntesis de SOD-1 y TRX1. Reduce IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1 y RANTES.	<i>In vitro</i> (Astrocitos fetales de humano)	(Sharma et al., 2007)
	Inhibe la muerte neuronal.		
	Reduce ROS y la carbonilación de proteínas.	<i>In vivo</i> (Ratón)	(Lu et al., 2010)
	Restaura Cu, Zn-SOD. Activa MAPK. Reduce iNOS, COX-2, TNF- α e IL-1 β . Inhibe NF- κ B.		
Rutina	Suprime la producción de TNF- α . Inhibe la activación NF- κ B.	<i>In vivo</i> (Ratón)	(Lee et al., 2012b)
	Inhibe el daño al hipocampo, reduce la activación de la microglía e IL-6/IL-1 β .	<i>In vivo</i> (Rata)	(Koda et al., 2009)
	Reduce (COX-2), IL-8, iNOS, NF- κ B, previene cambios morfológicos a nivel de hipocampo.	<i>In vivo</i> (Rata)	(Javed et al., 2012)

2.11. EFECTO DE RUTINA SOBRE LA AGREGACIÓN DEL PÉPTIDO β A EN RATONES TgAPP DE 16 MESES DE EDAD

En nuestro modelo experimental, a las 45 semanas de edad, no se detectó signos de neurodegeneración (Fluoro-Jade C) ni alteraciones en la morfología nuclear de neuronas de hipocampo (DAPI). Para verificar el efecto antiamiloidogénico mostrado por rutina (*in vitro*, en el modelo celular) se evaluó la presencia de placas amiloides en ratones hembra de 16 meses de edad: WT, TgAPP control y TgAPP tratados con rutina durante 4 semanas.

A los 16 meses de edad, por tinción con tioflavina T, se detectó las placas amiloides características de este modelo animal (Figura 81). En los ratones WT no se observó ningún agregado (Fig 81A) mientras que en los ratones TgAPP se evidenció la presencia de agregados amiloideos amorfos, producto de la sobreexpresión del gen APP^{swe} (Fig 81B). El tratamiento con rutina (Fig 81C) redujo en un 68% el número de placas seniles, y en un 75% el tamaño de las mismas, con respecto a los ratones TgAPP control, corroborando el efecto antiamiloidogénico observado *in vitro* y en el modelo celular.

Resultados similares fueron obtenidos por Rezai-Zadeh y col. (2008), quienes observaron que la administración oral de EGCG del té verde durante 6 meses en ratones que sobreexpresan la mutación sueca de APP (Tg2576) redujo significativamente los niveles del β A, lo que se tradujo en una mejora de la función cognitiva (Rezai-Zadeh et al., 2008).

También, se ha demostrado que el aceite de pescado en combinación con el EGCG, fue capaz de reducir las placas seniles y disminuir los niveles del péptido β A₁₋₄₀ y β A₁₋₄₂, evidenciando que posee un efecto sinérgico cuando se administra en cotratamiento a los ratones transgénicos Tg2576 (Giunta et al., 2010). Polifenoles como el ácido tánico han demostrado capacidad de reducir los depósitos del péptido β A, incluso disminuir la formación de los oligómeros de β A en un modelo de ratón transgénico específico para la EA. Este compuesto también inhibe el procesamiento amiloidogénico de APP, por reducción de la actividad BACE, por tanto disminuye la formación de APP- β (Mori et al., 2012). EGCG disminuye la expresión del ARNm de APP, por tanto los niveles de la proteína madura, reduciendo la amiloidosis cerebral en ratones transgénicos de EA (Rezai-Zadeh et al., 2005). La administración de curcumina a ratones transgénicos en un modelo de EA previene la oxidación de proteínas, la inflamación y reduce la formación de la forma soluble e insoluble del péptido β A hasta en un 50% (Lim et al., 2001).

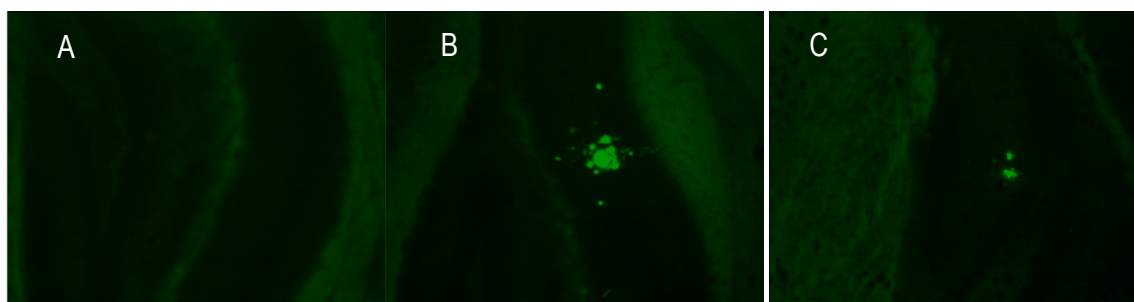


Figura 81. Placas seniles en hipocampo de ratones de 16 meses de edad. (A) WT, (B) TgAPP control, (C) TgAPP + R

En un estudio reciente se observó que los extractos ricos en antocianinas de arándano y mora, modulan el procesamiento de APP alterando significativamente los niveles de βA_{1-40} y βA_{1-42} . Además se observó que mejoran la memoria espacial en modelos animales para la EA evidenciando el papel neuroprotector de estos compuestos (Vepsäläinen et al., 2013).

3. CONCLUSIONES DEL ESTUDIO EN EL MODELO DE RATÓN TgAPP

En última instancia, se utilizó el ratón transgénico (Tg2576) que sobreexpresa APP^{swe} humana como modelo de Alzheimer experimental para el estudio del potencial efecto neuroprotector *in vivo* de rutina y quercetina.

1. En cuanto al modelo experimental, a las 45 semanas de edad, no se encontraron cambios significativos en el metabolismo cerebral entre ratones wild-type y ratones transgénicos, ni alteraciones a nivel de la expresión de receptores de glutamato (NMDA, AMPA y kainato). Tampoco se detectaron signos de neurodegeneración ni alteraciones en la morfología nuclear de neuronas de hipocampo.
2. La sobreexpresión de APP^{swe} a las 45 semanas de edad desencadenó en ambas áreas cerebrales: a) un marcado estrés oxidativo causado por una disminución generalizada de la actividad enzimática antioxidante, una disminución del poder reductor celular y un aumento de la peroxidación lipídica; b) favoreció la ruta amiloidogénica ya que se encontró aumentada la actividad enzimática de β -secretasa y la expresión de APP^{swe} y ligeramente disminuida la expresión de ADAM10, así como un aumento en la actividad de la caspasa 3; y c) un aumento de marcadores inflamatorios, especialmente IL-1 β , de acuerdo con la observación ampliamente descrita de que la inflamación favorece el procesamiento de APP por la vía amiloidogénica promoviendo la agregación del péptido β -amiloide.
3. Los cambios anteriormente descritos en el modelo animal se produjeron tanto en machos como en hembras.
4. Tanto en machos como en hembras, los animales tratados con rutina experimentaron un incremento en la actividad de catalasa y glutatión reductasa en corteza e hipocampo, hecho que promovería la protección neuronal frente al estrés oxidativo, así como la disminución del número y el tamaño de agregados amiloides de forma marcada, corroborando de esta forma el efecto antiamiloidogénico observado *in vitro* y en el modelo celular.
5. Los tratamientos con ambos flavonoides, sobre todo rutina, fueron capaces, tanto en machos como en hembras, de: a) inhibir la actividad enzimática de β -secretasa, disminuir la expresión de APP^{swe} e incrementar la expresión de ADAM10, en corteza e hipocampo; b) normalizar la expresión de IL-1 β en ambas áreas cerebrales; y c) disminuir la actividad de caspasa 3 a nivel de hipocampo.



CONCLUSIONES FINALES

En los ensayos de actividad antiamiloidogénica *in vitro* con los seis flavonoides estudiados:

1. Rutina fue capaz de inhibir la actividad enzimática β -secretasa de forma concentración-dependiente, lo que supondría una inhibición en la formación del β -amiloide. El grupo catecol en el anillo B podría promover la unión del compuesto al centro activo del enzima y la rutinosa, en la posición 3, estabilizar dicha unión.
2. Quercetina mostró una ligera capacidad inhibidora del complejo pentamérico γ -secretasa. El grupo hidroxilo en la posición 3 probablemente contribuya al efecto inhibidor del complejo enzimático puesto que la glicosilación en esta posición anula completamente el efecto.
3. Tanto quercetina como rutina presentaron una relevante capacidad inhibidora de la agregación *in vitro* de la amiloidogénesis, así como un importante efecto desagregante de las fibrillas previamente formadas. El grupo catecol en el anillo B de ambos flavonoles podría interrumpir la formación de los puentes de hidrógeno que configuran la estructura estable de las láminas β plegadas del agregado.
4. La inhibición de BACE y del complejo pentamérico γ -secretasa así como la importante capacidad inhibidora de la agregación *in vitro* y el efecto desagregante de las fibrillas previamente formadas, hace de quercetina y rutina buenos candidatos para profundizar en su estudio de actividad en modelos celulares y animales.

En la línea celular de neuroblastoma humano transfectada con el gen APP^{swe}, utilizada como modelo de Alzheimer experimental, se observó que:

5. Tanto quercetina como rutina fueron capaces de incrementar los niveles de glutatión reducido y por tanto el poder reductor celular, así como de disminuir los niveles de peroxidación lipídica.
6. El tratamiento de las células con ambos flavonoides favoreció en mayor o menor grado la actividad enzimática, la síntesis de proteína y la expresión génica de las principales enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa. Rutina produjo especialmente un incremento de catalasa y de glutatión reductasa, lo que podría explicar el aumento considerable de los niveles de glutatión reducido.
7. Tanto quercetina como rutina provocaron un incremento significativo en la actividad del proteasoma 20S y 26S en la línea celular en estudio, evento que promovería la resistencia celular al estrés oxidativo aumentando la supervivencia celular. Además, ambos flavonoides aumentaron los niveles y la expresión génica de PARP, proteína responsable de la reparación del ADN y de la activación del sistema proteasomal.
8. Rutina y quercetina provocaron una disminución de los niveles y expresión de APP, siendo rutina el flavonoide más activo. Además, el tratamiento de las células con rutina indujo un aumento de los niveles y expresión de ADAM-10, lo que podría favorecer la vía no amiloidogénica de procesamiento de APP.
9. Rutina fue capaz de inhibir la actividad enzimática y la expresión de caspasa 3 y caspasa 6. La inhibición farmacológica de estas proteasas puede ser de gran interés ya que APP puede ser sustrato de caspasas cuya hidrólisis enzimática puede liberar fragmentos neurotóxicos que favorecen la neurodegeneración.

10. Por tanto, en los ensayos en células se corroboró el buen perfil antioxidante de quercetina y rutina, así como la actividad antiamiloidogénica mostrada por ambos flavonoides en las técnicas *in vitro*.

En última instancia, se utilizó el ratón transgénico (Tg2576) que sobreexpresa APPswe humana como modelo de Alzheimer experimental para el estudio del potencial efecto neuroprotector *in vivo* de rutina y quercetina.

11. En cuanto al modelo experimental, a las 45 semanas de edad, no se encontraron cambios significativos en el metabolismo cerebral entre ratones wild-type y ratones transgénicos, ni alteraciones a nivel de la expresión de receptores de glutamato (NMDA, AMPA y kainato). Tampoco se detectaron signos de neurodegeneración ni alteraciones en la morfología nuclear de neuronas de hipocampo.

12. La sobreexpresión de APPswe a las 45 semanas de edad desencadenó en ambas áreas cerebrales: a) un marcado estrés oxidativo causado por una disminución generalizada de la actividad enzimática antioxidante, una disminución del poder reductor celular y un aumento de la peroxidación lipídica; b) favoreció la ruta amiloidogénica ya que se encontró aumentada la actividad enzimática de β -secretasa y la expresión de APPswe y ligeramente disminuida la expresión de ADAM10, así como un aumento en la actividad de la caspasa 3; y c) un aumento de marcadores inflamatorios, especialmente IL-1 β , de acuerdo con la observación ampliamente descrita de que la inflamación favorece el procesamiento de APP por la vía amiloidogénica promoviendo la agregación del péptido β -amiloide.

13. Los cambios anteriormente descritos en el modelo animal se produjeron tanto en machos como en hembras.

14. Tanto en machos como en hembras, los animales tratados con rutina experimentaron un incremento en la actividad de catalasa y glutatión reductasa en corteza e hipocampo, hecho que promovería la protección neuronal frente al estrés oxidativo, así como la disminución del número y el tamaño de agregados amiloides de forma marcada, corroborando de esta forma el efecto antiamiloidogénico observado *in vitro* y en el modelo celular.

15. Los tratamientos con ambos flavonoides, sobre todo rutina, fueron capaces, tanto en machos como en hembras, de: a) inhibir la actividad enzimática de β -secretasa, disminuir la expresión de APPswe e incrementar la expresión de ADAM10, en corteza e hipocampo; b) normalizar la expresión de IL-1 β en ambas áreas cerebrales; y c) disminuir la actividad de caspasa 3 a nivel de hipocampo.

Conclusión final: Tanto rutina como quercetina, por sus actividades: antioxidante, antiamiloidogénica, antiapoptótica y antiinflamatoria podrían prevenir y/o ralentizar diversas manifestaciones observadas en la enfermedad de Alzheimer, ya que han mostrado propiedades beneficiosas a nivel de múltiples dianas farmacológicas evaluadas en diferentes modelos de estudio de dicha enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdalla FH, Schmatz R, Cardoso AM, Carvalho FB, Baldissarelli J, de Oliveira JS, Rosa MM, Goncalves Nunes MA, Rubin MA, da Cruz IB, Barbisan F, Dressler VL, Pereira LB, Schetinger MR, Morsch VM, Goncalves JF, Mazzanti CM (2014) Quercetin protects the impairment of memory and anxiogenic-like behavior in rats exposed to cadmium: Possible involvement of the acetylcholinesterase and Na,K-ATPase activities. *Physiol Behav* 135C:152-167.
- Adhami VM, Syed DN, Khan N, Mukhtar H (2012) Dietary flavonoid fisetin: a novel dual inhibitor of PI3K/Akt and mTOR for prostate cancer management. *Biochem Pharmacol* 84:1277-1281.
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126.
- Akaishi T, Morimoto T, Shibao M, Watanabe S, Sakai-Kato K, Utsunomiya-Tate N, Abe K (2008) Structural requirements for the flavonoid fisetin in inhibiting fibril formation of amyloid beta protein. *Neurosci Lett* 444:280-285.
- Akiyama H et al. (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21:383-421.
- Alberici A, Moratto D, Benussi L, Gasparini L, Ghidoni R, Gatta LB, Finazzi D, Frisoni GB, Trabucchi M, Growdon JH, Nitsch RM, Binetti G (1999) Presenilin 1 protein directly interacts with Bcl-2. *J Biol Chem* 274:30764-30769.
- Albrecht S, Bogdanovic N, Ghetti B, Winblad B, LeBlanc AC (2009) Caspase-6 activation in familial alzheimer disease brains carrying amyloid precursor protein or presenilin i or presenilin II mutations. *J Neuropathol Exp Neurol* 68:1282-1293.
- Alia M, Mateos R, Ramos S, Lecumberri E, Bravo L, Goya L (2006) Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *Eur J Nutr* 45:19-28.
- Almeida CG, Takahashi RH, Gouras GK (2006) Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system. *J Neurosci* 26:4277-4288.
- Amelio I, Melino G, Knight RA (2011) Cell death pathology: cross-talk with autophagy and its clinical implications. *Biochem Biophys Res Commun* 414:277-281.
- Amit T, Avramovich-Tirosh Y, Youdim MB, Mandel S (2008) Targeting multiple Alzheimer's disease etiologies with multimodal neuroprotective and neurorestorative iron chelators. *FASEB J* 22:1296-1305.
- Anstey KJ, Mack HA, Cherbuin N (2009) Alcohol consumption as a risk factor for dementia and cognitive decline: meta-analysis of prospective studies. *Am J Geriatr Psychiatry* 17:542-555.
- Arai Y, Watanabe S, Kimira M, Shimoi K, Mochizuki R, Kinane N (2000) Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J Nutr* 130:2243-2250.
- Arnold J, Grune T (2002) PARP-mediated proteasome activation: a co-ordination of DNA repair and protein degradation? *Bioessays* 24:1060-1065.
- Arredondo F, Echeverry C, Abin-Carriquiry JA, Blasina F, Antunez K, Jones DP, Go YM, Liang YL, Dajas F (2010) After cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation, increases glutathione levels, and prevents neuronal death against an oxidative insult. *Free Radic Biol Med* 49:738-747.
- Asai M, Hattori C, Szabo B, Sasagawa N, Maruyama K, Tanuma S, Ishiura S (2003) Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochem Biophys Res Commun* 301:231-235.
- Atwood CS, Huang X, Khatir A, Scarpa RC, Kim YS, Moir RD, Tanzi RE, Roher AE, Bush AI (2000) Copper catalyzed oxidation of Alzheimer Aβ. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46:777-783.
- Atwood CS, Obrenovich ME, Liu T, Chan H, Perry G, Smith MA, Martins RN (2003) Amyloid-beta: a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid-beta. *Brain Res Brain Res Rev* 43:1-16.
- Atwood CS, Perry G, Zeng H, Kato Y, Jones WD, Ling KQ, Huang X, Moir RD, Wang D, Sayre LM, Smith MA, Chen SG, Bush AI (2004) Copper mediates dityrosine cross-linking of Alzheimer's amyloid-beta. *Biochemistry* 43:560-568.

- Augustin S, Rimbach G, Augustin K, Schliebs R, Wolffram S, Cermak R. (2009). Effect of a short- and long-term treatment with Ginkgo biloba extract on amyloid precursor protein levels in a transgenic mouse model relevant to Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys*, 481(2): 177-182.
- Augustin S, Rimbach G, Augustin K, Schliebs R, Wolffram S, Cermak R (2009) Effect of a short- and long-term treatment with Ginkgo biloba extract on amyloid precursor protein levels in a transgenic mouse model relevant to Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys* 481:177-182.
- Avila J (2010) Alzheimer disease: caspases first. *Nat Rev Neurol* 6:587-588.
- Balducci C, Forloni G (2011) APP transgenic mice: their use and limitations. *Neuromolecular Med* 13:117-137.
- Balk E, Chung M, Raman G, Tatsioni A, Chew P, Ip S, DeVine D, Lau J (2006) B vitamins and berries and age-related neurodegenerative disorders. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)*:1-161.
- Barberger-Gateau P, Raffaitin C, Letenneur L, Berr C, Tzourio C, Dartigues JF, Alperovitch A (2007) Dietary patterns and risk of dementia: the Three-City cohort study. *Neurology* 69:1921-1930.
- Barger SW, Harmon AD (1997) Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. *Nature* 388:878-881.
- Barja de Quiroga G, Perez-Campo R, Lopez Torres M (1990) Anti-oxidant defences and peroxidation in liver and brain of aged rats. *Biochem J* 272:247-250.
- Barker JE, Bolanos JP, Land JM, Clark JB, Heales SJ (1996) Glutathione protects astrocytes from peroxynitrite-mediated mitochondrial damage: implications for neuronal/astrocytic trafficking and neurodegeneration. *Dev Neurosci* 18:391-396.
- Bayer TA, Schafer S, Breyhan H, Wirths O, Treiber C, Multhaup G (2006) A vicious circle: role of oxidative stress, intraneuronal Abeta and Cu in Alzheimer's disease. *Clin Neuropathol* 25:163-171.
- Beckmann DV, Carvalho FB, Mazzanti CM, Dos Santos RP, Andrades AO, Aiello G, Rippilinger A, Graca DL, Abdalla FH, Oliveira LS, Gutierrez JM, Schetinger MR, Mazzanti A (2014) Neuroprotective role of quercetin in locomotor activities and cholinergic neurotransmission in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide. *Life Sci* 103:79-87.
- Beking K, Vieira A (2010) Flavonoid intake and disability-adjusted life years due to Alzheimer's and related dementias: a population-based study involving twenty-three developed countries. *Public Health Nutr* 13:1403-1409.
- Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW (2010) Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 23:213-227.
- Berezovska O, Jack C, McLean P, Aster JC, Hicks C, Xia W, Wolfe MS, Kimberly WT, Weinmaster G, Selkoe DJ, Hyman BT (2000) Aspartate mutations in presenilin and gamma-secretase inhibitors both impair notch1 proteolysis and nuclear translocation with relative preservation of notch1 signaling. *J Neurochem* 75:583-593.
- Bermejo-Pareja F, Antequera D, Vargas T, Molina JA, Carro E (2010) Saliva levels of Abeta1-42 as potential biomarker of Alzheimer's disease: a pilot study. *BMC Neurol* 10:108.
- Bezprozvanny I (2009) Calcium signaling and neurodegenerative diseases. *Trends Mol Med* 15:89-100.
- Bezprozvanny IB (2010) Calcium signaling and neurodegeneration. *Acta Naturae* 2:72-82.
- Bhat NR, Zhang P, Lee JC, Hogan EL (1998) Extracellular signal-regulated kinase and p38 subgroups of mitogen-activated protein kinases regulate inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha gene expression in endotoxin-stimulated primary glial cultures. *J Neurosci* 18:1633-1641.
- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H (2006) Alzheimer's disease. *Lancet* 368:387-403.
- Block ML, Zecca L, Hong JS (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8:57-69.
- Boland B, Kumar A, Lee S, Platt FM, Wegiel J, Yu WH, Nixon RA (2008) Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 28:6926-6937.

- Bolanos JP, Heales SJ, Land JM, Clark JB (1995) Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurones and astrocytes in primary culture. *J Neurochem* 64:1965-1972.
- Bonda DJ, Wang X, Perry G, Nunomura A, Tabaton M, Zhu X, Smith MA (2010) Oxidative stress in Alzheimer disease: a possibility for prevention. *Neuropharmacology* 59:290-294.
- Bordji K, Becerril-Ortega J, Nicole O, Buisson A (2010) Activation of extrasynaptic, but not synaptic, NMDA receptors modifies amyloid precursor protein expression pattern and increases amyloid-ss production. *J Neurosci* 30:15927-15942.
- Bores GM, Huger FP, Petko W, Mutlib AE, Camacho F, Rush DK, Selk DE, Wolf V, Kosley RW, Jr., Davis L, Vargas HM (1996) Pharmacological evaluation of novel Alzheimer's disease therapeutics: acetylcholinesterase inhibitors related to galanthamine. *J Pharmacol Exp Ther* 277:728-738.
- Borg JP, Yang Y, De Taddeo-Borg M, Margolis B, Turner RS (1998) The X11alpha protein slows cellular amyloid precursor protein processing and reduces Abeta40 and Abeta42 secretion. *J Biol Chem* 273:14761-14766.
- Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA (2004) Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med* 10 Suppl:S2-9.
- Bourdel-Marchasson I, Delmas-Beauvieux MC, Peuchant E, Richard-Harston S, Decamps A, Reignier B, Emeriau JP, Rainfray M (2001) Antioxidant defences and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients. *Age Ageing* 30:235-241.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Bradley JR (2008) TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 214:149-160.
- Bredesen DE (2009) Neurodegeneration in Alzheimer's disease: caspases and synaptic element interdependence. *Mol Neurodegener* 4:27.
- Brito PM, Mariano A, Almeida LM, Dinis TC (2006) Resveratrol affords protection against peroxynitrite-mediated endothelial cell death: A role for intracellular glutathione. *Chem Biol Interact* 164:157-166.
- Brown JC, Wang J, Kasman L, Jiang X, Haley-Zitlin V (2011) Activities of muscadine grape skin and quercetin against *Helicobacter pylori* infection in mice. *J Appl Microbiol* 110:139-146.
- Browne TC, McQuillan K, McManus RM, O'Reilly JA, Mills KH, Lynch MA (2013) IFN-gamma Production by amyloid beta-specific Th1 cells promotes microglial activation and increases plaque burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Immunol* 190:2241-2251.
- Bruton R, Qume M (1999) [3H]-GABA binding to GABAA and GABAB sites on rat brain crude synaptic membranes. *Methods Mol Biol* 106:27-35.
- Bureau G, Longpre F, Martinoli MG (2008) Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation. *J Neurosci Res* 86:403-410.
- Burguillos MA, Deierborg T, Kavanagh E, Persson A, Hajji N, Garcia-Quintanilla A, Cano J, Brundin P, Englund E, Venero JL, Joseph B (2011) Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. *Nature* 472:319-324.
- Burke SN, Barnes CA (2006) Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci* 7:30-40.
- Busciglio J, Pelsman A, Wong C, Pigino G, Yuan M, Mori H, Yankner BA (2002) Altered metabolism of the amyloid beta precursor protein is associated with mitochondrial dysfunction in Down's syndrome. *Neuron* 33:677-688.
- Butterfield DA, Bader Lange ML, Sultana R (2010) Involvements of the lipid peroxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1801:924-929.
- Butterfield DA, Barone E, Mancuso C (2011) Cholesterol-independent neuroprotective and neurotoxic activities of statins: perspectives for statin use in Alzheimer disease and other age-related neurodegenerative disorders. *Pharmacol Res* 64:180-186.

- Butterfield DA, Boyd-Kimball D (2005) The critical role of methionine 35 in Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1703:149-156.
- Butterfield DA, Castegna A, Lauderback CM, Drake J (2002) Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol Aging* 23:655-664.
- Butterfield DA, Reed T, Newman SF, Sultana R (2007) Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radic Biol Med* 43:658-677.
- Butterfield DA, Swomley AM, Sultana R (2013) Amyloid beta-Peptide (1-42)-Induced Oxidative Stress in Alzheimer Disease: Importance in Disease Pathogenesis and Progression. *Antioxid Redox Signal* 19:823-835.
- Cagnin A, Brooks DJ, Kennedy AM, Gunn RN, Myers R, Turkheimer FE, Jones T, Banati RB (2001) In-vivo measurement of activated microglia in dementia. *Lancet* 358:461-467.
- Cai H, Wang Y, McCarthy D, Wen H, Borchelt DR, Price DL, Wong PC (2001) BACE is the major beta-secretase for generation of A β peptides by neurons. *Nat Neurosci* 4:233-234.
- Cai XD, Golde TE, Younkin SG (1993) Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. *Science* 259:514-516.
- Cai Z, Hussain MD, Yan LJ (2013) Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Int J Neurosci*.
- Cai Z, Zhao Y, Zhao B (2012) Roles of glycogen synthase kinase 3 in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 9:864-879.
- Calhoun ME, Wiederhold KH, Abramowski D, Phinney AL, Probst A, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Sommer B, Jucker M (1998) Neuron loss in APP transgenic mice. *Nature* 395:755-756.
- Cao J, Chen X, Liang J, Yu XQ, Xu AL, Chan E, Wei D, Huang M, Wen JY, Yu XY, Li XT, Sheu FS, Zhou SF (2007) Role of P-glycoprotein in the intestinal absorption of glabridin, an active flavonoid from the root of *Glycyrrhiza glabra*. *Drug Metab Dispos* 35:539-553.
- Casado A, Encarnacion Lopez-Fernandez M, Concepcion Casado M, de La Torre R (2008) Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in vascular and Alzheimer dementias. *Neurochem Res* 33:450-458.
- Casas C, Sergeant N, Itier JM, Blanchard V, Wirths O, van der Kolk N, Vingtdeux V, van de Steeg E, Ret G, Canton T, Drobecq H, Clark A, Bonici B, Delacourte A, Benavides J, Schmitz C, Tremp G, Bayer TA, Benoit P, Pradier L (2004) Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated A β 42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *Am J Pathol* 165:1289-1300.
- Casley CS, Land JM, Sharpe MA, Clark JB, Duchon MR, Canevari L (2002) Beta-amyloid fragment 25-35 causes mitochondrial dysfunction in primary cortical neurons. *Neurobiol Dis* 10:258-267.
- Castellani RJ, Honda K, Zhu X, Cash AD, Nunomura A, Perry G, Smith MA (2004) Contribution of redox-active iron and copper to oxidative damage in Alzheimer disease. *Ageing Res Rev* 3:319-326.
- Caviston JP, Holzbaur EL (2006) Microtubule motors at the intersection of trafficking and transport. *Trends Cell Biol* 16:530-537.
- Cencioni C, Spallotta F, Martelli F, Valente S, Mai A, Zeiher AM, Gaetano C (2013) Oxidative stress and epigenetic regulation in ageing and age-related diseases. *Int J Mol Sci* 14:17643-17663.
- Chan YC, Hosoda K, Tsai CJ, Yamamoto S, Wang MF (2006) Favorable effects of tea on reducing the cognitive deficits and brain morphological changes in senescence-accelerated mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 52:266-273.
- Chang HC, Yang YR, Wang PS, Wang RY (2014) Quercetin Enhances Exercise-Mediated Neuroprotective Effects in Brain Ischemic Rats. *Med Sci Sports Exerc*.
- Chen D, Daniel KG, Chen MS, Kuhn DJ, Landis-Piowar KR, Dou QP (2005a) Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 69:1421-1432.

- Chen JC, Ho FM, Pei-Dawn Lee C, Chen CP, Jeng KC, Hsu HB, Lee ST, Wen Tung W, Lin WW (2005b) Inhibition of iNOS gene expression by quercetin is mediated by the inhibition of IkappaB kinase, nuclear factor-kappa B and STAT1, and depends on heme oxygenase-1 induction in mouse BV-2 microglia. *Eur J Pharmacol* 521:9-20.
- Chin J (2011) Selecting a mouse model of Alzheimer's disease. *Methods Mol Biol* 670:169-189.
- Chishti MA et al. (2001) Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *J Biol Chem* 276:21562-21570.
- Chohan MO, Iqbal K (2006) From tau to toxicity: emerging roles of NMDA receptor in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 10:81-87.
- Choi DW, Koh JY, Peters S (1988) Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *J Neurosci* 8:185-196.
- Choi DY, Lee YJ, Hong JT, Lee HJ (2012) Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease. *Brain Res Bull* 87:144-153.
- Choi JS, Piao YJ, Kang KW (2011) Effects of quercetin on the bioavailability of doxorubicin in rats: role of CYP3A4 and P-gp inhibition by quercetin. *Arch Pharm Res* 34:607-613.
- Choi RC, Zhu JT, Leung KW, Chu GK, Xie HQ, Chen VP, Zheng KY, Lau DT, Dong TT, Chow PC, Han YF, Wang ZT, Tsim KW (2010) A flavonol glycoside, isolated from roots of *Panax notoginseng*, reduces amyloid-beta-induced neurotoxicity in cultured neurons: signaling transduction and drug development for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 19:795-811.
- Chondrogianni N, Gonos ES (2008) Proteasome activation as a novel antiaging strategy. *IUBMB Life* 60:651-655.
- Chong MF, Macdonald R, Lovegrove JA (2010) Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies. *Br J Nutr* 104 Suppl 3:S28-39.
- Ciechanover A (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J* 17:7151-7160.
- Ciechanover A (2005) Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:79-87.
- Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ (1992) Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360:672-674.
- Coleta M, Campos MG, Cotrim MD, Lima TC, Cunha AP (2008) Assessment of luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone) neuropharmacological activity. *Behav Brain Res* 189:75-82.
- Convertino M, Pellarin R, Catto M, Carotti A, Caflisch A (2009) 9,10-Anthraquinone hinders beta-aggregation: how does a small molecule interfere with Abeta-peptide amyloid fibrillation? *Protein Sci* 18:792-800.
- Coskun PE, Beal MF, Wallace DC (2004) Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10726-10731.
- Coulson EJ, Paliga K, Beyreuther K, Masters CL (2000) What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochem Int* 36:175-184.
- Crimins JL, Pooler A, Polydoro M, Luebke JI, Spires-Jones TL (2013) The intersection of amyloid beta and tau in glutamatergic synaptic dysfunction and collapse in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 12:757-763.
- Dai Q, Borenstein AR, Wu Y, Jackson JC, Larson EB (2006) Fruit and vegetable juices and Alzheimer's disease: the Kame Project. *Am J Med* 119:751-759.
- Dajas F, Andres AC, Florencia A, Carolina E, Felicia RM (2013) Neuroprotective actions of flavones and flavonols: mechanisms and relationship to flavonoid structural features. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 13:30-35.

- D'Amelio M, Cavallucci V, Middei S, Marchetti C, Pacioni S, Ferri A, Diamantini A, De Zio D, Carrara P, Battistini L, Moreno S, Bacci A, Ammassari-Teule M, Marie H, Cecconi F (2010) Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 14:69-76.
- D'Amelio M, Sheng M, Cecconi F (2012) Caspase-3 in the central nervous system: beyond apoptosis. *Trends Neurosci* 35:700-709.
- Davies CA, Loddick SA, Toulmond S, Stroemer RP, Hunt J, Rothwell NJ (1999) The progression and topographic distribution of interleukin-1 β expression after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:87-98.
- Davies KJ (2001) Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie* 83:301-310.
- Dawson GR, Seabrook GR, Zheng H, Smith DW, Graham S, O'Dowd G, Bowery BJ, Boyce S, Trumbauer ME, Chen HY, Van der Ploeg LH, Sirinathsinghji DJ (1999) Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience* 90:1-13.
- de Boer AG, Gaillard PJ (2007) Drug targeting to the brain. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:323-355.
- de Calignon A, Fox LM, Pitstick R, Carlson GA, Bacskai BJ, Spires-Jones TL, Hyman BT (2010) Caspase activation precedes and leads to tangles. *Nature* 464:1201-1204.
- De Felice FG, Wu D, Lambert MP, Fernandez SJ, Velasco PT, Lacor PN, Bigio EH, Jerecic J, Acton PJ, Shughrue PJ, Chen-Dodson E, Kinney GG, Klein WL (2008) Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers. *Neurobiol Aging* 29:1334-1347.
- de Haan JB, Susil B, Pritchard M, Kola I (2003) An altered antioxidant balance occurs in Down syndrome fetal organs: implications for the "gene dosage effect" hypothesis. *J Neural Transm Suppl*:67-83.
- De Strooper B (2007) Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. *Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. EMBO Rep* 8:141-146.
- De Strooper B, Annaert W (2000) Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci* 113 (Pt 11):1857-1870.
- Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F (1999) Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci* 65:337-353.
- Ding Q, Keller JN (2001) Proteasomes and proteasome inhibition in the central nervous system. *Free Radic Biol Med* 31:574-584.
- Donev R, Kolev M, Millet B, Thome J (2009) Neuronal death in Alzheimer's disease and therapeutic opportunities. *J Cell Mol Med* 13:4329-4348.
- Dong XX, Wang Y, Qin ZH (2009) Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin* 30:379-387.
- Dubois A, Herard AS, Delatour B, Hantraye P, Bonvento G, Dhenain M, Delzescaux T (2010) Detection by voxel-wise statistical analysis of significant changes in regional cerebral glucose uptake in an APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroimage* 51:586-598.
- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, Delacourte A, Galasko D, Gauthier S, Jicha G, Meguro K, O'Brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S, Stern Y, Visser PJ, Scheltens P (2007) Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* 6:734-746.
- Dumanchin-Njock C, Alves da Costa CA, Mercken L, Pradier L, Checler F (2001) The caspase-derived C-terminal fragment of betaAPP induces caspase-independent toxicity and triggers selective increase of Abeta42 in mammalian cells. *J Neurochem* 78:1153-1161.
- Dumont M, Beal MF (2011) Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 51:1014-1026.
- Echeverry C, Arredondo F, Abin-Carriquiry JA, Midiwo JO, Ochieng C, Kerubo L, Dajas F (2010) Pretreatment with natural flavones and neuronal cell survival after oxidative stress: a structure-activity relationship study. *J Agric Food Chem* 58:2111-2115.

- Elias MF, Davey A (2012) Midlife blood pressure, amyloid-beta, and risk for Alzheimer disease: one more reason to treat hypertension. *Hypertension* 59:771-772.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Jr., Feather-Stone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88-95.
- Emre M, Mecocci P, Stender K (2008) Pooled analyses on cognitive effects of memantine in patients with moderate to severe Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 14:193-199.
- Evangelisti E, Wright D, Zampagni M, Cascella R, Fiorillo C, Bagnoli S, Relini A, Nichino D, Scartabelli T, Nacmias B, Sorbi S, Cecchi C (2012) Lipid rafts mediate amyloid-induced calcium dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 10:143-153.
- Fan LY, Chiu MJ (2011) Pharmacological treatment for Alzheimer's disease: current approaches and future strategies. *Acta Neurol Taiwan* 19:228-245.
- Faria A, Pestana D, Teixeira D, Azevedo J, De Freitas V, Mateus N, Calhau C. (2010). Flavonoid transport across RBE4 cells: A blood-brain barrier model. *Cell Mol Biol Lett* 15:234-241.
- Feroz SR, Mohamad SB, Bakri ZS, Malek SN, Tayyab S (2013) Probing the interaction of a therapeutic flavonoid, pinostrobin with human serum albumin: multiple spectroscopic and molecular modeling investigations. *PLoS One* 8:e76067.
- Ferreira IL, Resende R, Ferreiro E, Rego AC, Pereira CF (2010) Multiple defects in energy metabolism in Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets* 11:1193-1206.
- Fonseca AC, Ferreiro E, Oliveira CR, Cardoso SM, Pereira CF (2013) Activation of the endoplasmic reticulum stress response by the amyloid-beta 1-40 peptide in brain endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1832:2191-2203.
- Forsberg A, Almkvist O, Engler H, Wall A, Langstrom B, Nordberg A (2010) High PIB retention in Alzheimer's disease is an early event with complex relationship with CSF biomarkers and functional parameters. *Curr Alzheimer Res* 7:56-66.
- Frautschy SA, Yang F, Irrizarry M, Hyman B, Saido TC, Hsiao K, Cole GM (1998) Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *Am J Pathol* 152:307-317.
- Galluzzi L, Blomgren K, Kroemer G (2009) Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nat Rev Neurosci* 10:481-494.
- Gamblin TC, Chen F, Zambrano A, Abraha A, Lagalwar S, Guillozet AL, Lu M, Fu Y, Garcia-Sierra F, LaPointe N, Miller R, Berry RW, Binder LI, Cryns VL (2003) Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10032-10037.
- Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, et al. (1995) Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373:523-527.
- Garcia-Escudero V, Martin-Maestro P, Perry G, Avila J (2013) Deconstructing mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease. *Oxid Med Cell Longev* 2013:162152.
- Gauci AJ, Caruana M, Giese A, Scerri C, Vassallo N. (2012) Identification of polyphenolic compounds and black tea extract as potent inhibitors of lipid membrane destabilization by Abeta(4)(2) aggregates. *J Alzheimers Dis* 27:767-779.
- Gervais FG, Xu D, Robertson GS, Vaillancourt JP, Zhu Y, Huang J, LeBlanc A, Smith D, Rigby M, Shearman MS, Clarke EE, Zheng H, Van Der Ploeg LH, Ruffolo SC, Thornberry NA, Xanthoudakis S, Zamboni RJ, Roy S, Nicholson DW (1999) Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation. *Cell* 97:395-406.
- Ghosh AK, Brindisi M, Tang J (2012) Developing beta-secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 120 Suppl 1:71-83.
- Giacobini E (1990) The cholinergic system in Alzheimer disease. *Prog Brain Res* 84:321-332.

- Giannakopoulos P, Herrmann FR, Bussiere T, Bouras C, Kovari E, Perl DP, Morrison JH, Gold G, Hof PR (2003) Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology* 60:1495-1500.
- Gibson GE, Chen HL, Xu H, Qiu L, Xu Z, Denton TT, Shi Q (2012) Deficits in the mitochondrial enzyme alpha-ketoglutarate dehydrogenase lead to Alzheimer's disease-like calcium dysregulation. *Neurobiol Aging* 33:1121 e1113-1124.
- Gilabert JA (2012) Cytoplasmic calcium buffering. *Adv Exp Med Biol* 740:483-498.
- Girish C, Raj V, Arya J, Balakrishnan S (2013) Involvement of the GABAergic system in the anxiolytic-like effect of the flavonoid ellagic acid in mice. *Eur J Pharmacol* 710:49-58.
- Giunta B, Hou H, Zhu Y, Salemi J, Ruscin A, Shytle RD, Tan J (2010) Fish oil enhances anti-amyloidogenic properties of green tea EGCG in Tg2576 mice. *Neurosci Lett* 471:134-138.
- Glabe CC (2005) Amyloid accumulation and pathogenesis of Alzheimer's disease: significance of monomeric, oligomeric and fibrillar A β . *Subcell Biochem* 38:167-177.
- Glenner GG, Wong CW, Quaranta V, Eanes ED (1984) The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl Pathol* 2:357-369.
- Glickman MH, Rubin DM, Fried VA, Finley D (1998) The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol* 18:3149-3162.
- Glickman MH, Rubin DM, Fu H, Larsen CN, Coux O, Wefes I, Pfeifer G, Cjeka Z, Vierstra R, Baumeister W, Fried V, Finley D (1999) Functional analysis of the proteasome regulatory particle. *Mol Biol Rep* 26:21-28.
- Goldstein FC, Ashley AV, Endeshaw YW, Hanfelt J, Lah JJ, Levey AI (2008) Effects of hypertension and hypercholesterolemia on cognitive functioning in patients with alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 22:336-342.
- Gonzalez-Segovia R, Quintanar JL, Salinas E, Ceballos-Salazar R, Aviles-Jimenez F, Torres-Lopez J (2008) Effect of the flavonoid quercetin on inflammation and lipid peroxidation induced by *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of guinea pig. *J Gastroenterol* 43:441-447.
- Gracia-Garcia P, de-la-Camara C, Santabarbara J, Lopez-Anton R, Quintanilla MA, Ventura T, Marcos G, Campayo A, Saz P, Lyketsos C, Lobo A (2013) Depression and Incident Alzheimer Disease: The Impact of Disease Severity. *Am J Geriatr Psychiatry*.
- Graham RK, Ehrnhoefer DE, Hayden MR (2011) Caspase-6 and neurodegeneration. *Trends Neurosci* 34:646-656.
- Greenfield JP, Tsai J, Gouras GK, Hai B, Thinakaran G, Checler F, Sisodia SS, Greengard P, Xu H (1999) Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer beta-amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:742-747.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM (1986) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261:6084-6089.
- Guerreiro RJ, Gustafson DR, Hardy J (2012) The genetic architecture of Alzheimer's disease: beyond APP, PSENs and APOE. *Neurobiol Aging* 33:437-456.
- Guerreiro RJ, Hardy J (2011) Alzheimer's disease genetics: lessons to improve disease modelling. *Biochem Soc Trans* 39:910-916.
- Guo H, Albrecht S, Bourdeau M, Petzke T, Bergeron C, LeBlanc AC (2004) Active caspase-6 and caspase-6-cleaved tau in neuropil threads, neuritic plaques, and neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 165:523-531.
- Gustaw-Rothenberg K, Kowalczyk K, Stryjecka-Zimmer M (2010) Lipids' peroxidation markers in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Geriatr Gerontol Int* 10:161-166.
- Haase N, Herse F, Spallek B, Haase H, Morano I, Qadri F, Szijarto IA, Rohm I, Yilmaz A, Warrington JP, Ryan MJ, Gollasch M, Muller DN, Dechend R, Wallukat G (2013) Amyloid-beta Peptides Activate alpha1-Adrenergic Cardiovascular Receptors. *Hypertension*.

- Haass C, Hung AY, Selkoe DJ, Teplow DB (1994) Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor. *J Biol Chem* 269:17741-17748.
- Haass C, Selkoe DJ (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:101-112.
- Hadjeri M, Barbier M, Ronot X, Mariotte AM, Boumendjel A, Boutonnat J (2003) Modulation of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by flavonoid derivatives and analogues. *J Med Chem* 46:2125-2131.
- Halliwell B (2012) The antioxidant paradox: less paradoxical now? *Br J Clin Pharmacol* 75:637-644.
- Hardy J, Pittman A, Myers A, Fung HC, de Silva R, Duckworth J (2006) Tangle diseases and the tau haplotypes. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 20:60-62.
- Harold D et al. (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41:1088-1093.
- Hartman RE, Shah A, Fagan AM, Schwetye KE, Parsadanian M, Schulman RN, Finn MB, Holtzman DM (2006) Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 24:506-515.
- Hattori H (2013) [Effectiveness and limitation of newly approved drugs for Alzheimer's disease]. *Seishin Shinkeigaku Zasshi* 115:22-31.
- Haughey NJ, Mattson MP (2003) Alzheimer's amyloid beta-peptide enhances ATP/gap junction-mediated calcium-wave propagation in astrocytes. *Neuromolecular Med* 3:173-180.
- He P, Zhong Z, Lindholm K, Berning L, Lee W, Lemere C, Staufenbiel M, Li R, Shen Y (2007) Deletion of tumor necrosis factor death receptor inhibits amyloid beta generation and prevents learning and memory deficits in Alzheimer's mice. *J Cell Biol* 178:829-841.
- Heinemeyer W, Ramos PC, Dohmen RJ (2004) The ultimate nanoscale mincer: assembly, structure and active sites of the 20S proteasome core. *Cell Mol Life Sci* 61:1562-1578.
- Hendra R, Ahmad S, Sukari A, Shukor MY, Oskoueian E (2011) Flavonoid Analyses and Antimicrobial Activity of Various Parts of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl Fruit. *Int J Mol Sci* 12:3422-3431.
- Heneka MT, O'Banion MK, Terwel D, Kummer MP (2010) Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 117:919-947.
- Hensley K (2010) Neuroinflammation in Alzheimer's disease: mechanisms, pathologic consequences, and potential for therapeutic manipulation. *J Alzheimers Dis* 21:1-14.
- Heo HJ, Lee CY (2004) Protective effects of quercetin and vitamin C against oxidative stress-induced neurodegeneration. *J Agric Food Chem* 52:7514-7517.
- Hermes M, Eichhoff G, Garaschuk O (2010) Intracellular calcium signalling in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 14:30-41.
- Herms J, Anliker B, Heber S, Ring S, Fuhrmann M, Kretschmar H, Sisodia S, Muller U (2004) Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J* 23:4106-4115.
- Hernandez F, Avila J (2008) Tau aggregates and tau pathology. *J Alzheimers Dis* 14:449-452.
- Herschman HR (2003) Micro-PET imaging and small animal models of disease. *Curr Opin Immunol* 15:378-384.
- Hertog MG, Hollman PC (1996) Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. *Eur J Clin Nutr* 50:63-71.
- Higgins GC, Beart PM, Shin YS, Chen MJ, Cheung NS, Nagley P (2010) Oxidative stress: emerging mitochondrial and cellular themes and variations in neuronal injury. *J Alzheimers Dis* 20 Suppl 2:S453-473.
- Hirohata M, Hasegawa K, Tsutsumi-Yasuhara S, Ohhashi Y, Ookoshi T, Ono K, Yamada M, Naiki H (2007) The anti-amyloidogenic effect is exerted against Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro by preferential and reversible binding of flavonoids to the amyloid fibril structure. *Biochemistry* 46:1888-1899.

- Ho L, Yemul S, Wang J, Pasinetti GM (2009) Grape seed polyphenolic extract as a potential novel therapeutic agent in tauopathies. *J Alzheimers Dis* 16:433-439.
- Hoenicka J (2006) [Genes in Alzheimer's disease]. *Rev Neurol* 42:302-305.
- Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, Wright K, Saad I, Mueller R, Morgan D, Sanders S, Zehr C, O'Campo K, Hardy J, Prada CM, Eckman C, Younkin S, Hsiao K, Duff K (1998) Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med* 4:97-100.
- Hollingsworth P et al. (2011) Genome-wide association study of Alzheimer's disease with psychotic symptoms. *Mol Psychiatry* 17:1316-1327.
- Honarnejad K, Jung CK, Lammich S, Arzberger T, Kretschmar H, Herms J (2013) Involvement of presenilin holoprotein upregulation in calcium dyshomeostasis of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 17:293-302.
- Honson NS, Johnson RL, Huang W, Inglese J, Austin CP, Kuret J (2007) Differentiating Alzheimer disease-associated aggregates with small molecules. *Neurobiol Dis* 28:251-260.
- Hoozemans JJ, Veerhuis R, Rozemuller JM, Eikelenboom P (2011) Soothing the inflamed brain: effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on Alzheimer's disease pathology. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 10:57-67.
- Hoppe UC (2010) Mitochondrial calcium channels. *FEBS Lett* 584:1975-1981.
- Horowitz PM, Patterson KR, Guillozet-Bongaarts AL, Reynolds MR, Carroll CA, Weintraub ST, Bennett DA, Cryns VL, Berry RW, Binder LI (2004) Early N-terminal changes and caspase-6 cleavage of tau in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24:7895-7902.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G (1996) Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274:99-102.
- Huang X, Moir RD, Tanzi RE, Bush AI, Rogers JT (2004) Redox-active metals, oxidative stress, and Alzheimer's disease pathology. *Ann N Y Acad Sci* 1012:153-163.
- Hui KM, Huen MS, Wang HY, Zheng H, Sigel E, Baur R, Ren H, Li ZW, Wong JT, Xue H (2002) Anxiolytic effect of wogonin, a benzodiazepine receptor ligand isolated from *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochem Pharmacol* 64:1415-1424.
- Hung AY, Selkoe DJ (1994) Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein. *EMBO J* 13:534-542.
- Hyman BT, Yuan J (2012) Apoptotic and non-apoptotic roles of caspases in neuronal physiology and pathophysiology. *Nat Rev Neurosci* 13:395-406.
- Ihara Y, Morishima-Kawashima M, Nixon R (2012) The ubiquitin-proteasome system and the autophagolysosomal system in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2.
- Ihl R (2013) Effects of Ginkgo biloba extract EGb 761 (R) in dementia with neuropsychiatric features: review of recently completed randomised, controlled trials. *Int J Psychiatry Clin Pract* 17 Suppl 1:8-14.
- Ishige K, Schubert D, Sagara Y (2001) Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic Biol Med* 30:433-446.
- Ishii K (2002) Clinical application of positron emission tomography for diagnosis of dementia. *Ann Nucl Med* 16:515-525.
- Ishii K, Imamura T, Sasaki M, Yamaji S, Sakamoto S, Kitagaki H, Hashimoto M, Hirono N, Shimomura T, Mori E (1998) Regional cerebral glucose metabolism in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. *Neurology* 51:125-130.
- Ishii K, Soma T, Kono AK, Sofue K, Miyamoto N, Yoshikawa T, Mori E, Murase K (2007) Comparison of regional brain volume and glucose metabolism between patients with mild dementia with lewy bodies and those with mild Alzheimer's disease. *J Nucl Med* 48:704-711.
- Jagust W, Reed B, Mungas D, Ellis W, Decarli C (2007) What does fluorodeoxyglucose PET imaging add to a clinical diagnosis of dementia? *Neurology* 69:871-877.

- Jamaluddin MS, Liang Z, Lu JM, Yao Q, Chen C (2013) Roles of cardiovascular risk factors in endothelial nitric oxide synthase regulation: an update. *Curr Pharm Des* 20:3563-3578.
- Javed H, Khan MM, Ahmad A, Vaibhav K, Ahmad ME, Khan A, Ashafaq M, Islam F, Siddiqui MS, Safhi MM (2012) Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type. *Neuroscience* 210:340-352.
- Jellinger KA (2006) Challenges in neuronal apoptosis. *Curr Alzheimer Res* 3:377-391.
- Jiang J, Wang Y, Hou L, Fan L, Wang Q, Xu Z, Sun Q, Liu H (2013) Distinct roles of sAPP- α and sAPP- β in regulating U251 cell differentiation. *Curr Alzheimer Res* 10:706-713.
- Johnson VE, Stewart W, Smith DH (2010) Traumatic brain injury and amyloid- β pathology: a link to Alzheimer's disease? *Nat Rev Neurosci* 11:361-370.
- Jones JR, Lebar MD, Jinwal UK, Abisambra JF, Koren J, 3rd, Blair L, O'Leary JC, Davey Z, Trotter J, Johnson AG, Weeber E, Eckman CB, Baker BJ, Dickey CA (2011) The diarylheptanoid (+)-aR,11S-myricanol and two flavones from bayberry (*Myrica cerifera*) destabilize the microtubule-associated protein tau. *J Nat Prod* 74:38-44.
- Joseph JA, Denisova NA, Arendash G, Gordon M, Diamond D, Shukitt-Hale B, Morgan D (2003) Blueberry supplementation enhances signaling and prevents behavioral deficits in an Alzheimer disease model. *Nutr Neurosci* 6:153-162.
- Jung T, Bader N, Grune T (2007) Oxidized proteins: intracellular distribution and recognition by the proteasome. *Arch Biochem Biophys* 462:231-237.
- Jung T, Catalgol B, Grune T (2009) The proteasomal system. *Mol Aspects Med* 30:191-296.
- Jung T, Grune T (2008) The proteasome and its role in the degradation of oxidized proteins. *IUBMB Life* 60:743-752.
- Kaether C, Haass C, Steiner H (2006) Assembly, trafficking and function of gamma-secretase. *Neurodegener Dis* 3:275-283.
- Kallhoff-Munoz V, Hu L, Chen X, Pautler RG, Zheng H (2008) Genetic dissection of gamma-secretase-dependent and -independent functions of presenilin in regulating neuronal cell cycle and cell death. *J Neurosci* 28:11421-11431.
- Kamal A, Almenar-Queralt A, LeBlanc JF, Roberts EA, Goldstein LS (2001) Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature* 414:643-648.
- Kao TK, Ou YC, Raung SL, Lai CY, Liao SL, Chen CJ (2010) Inhibition of nitric oxide production by quercetin in endotoxin/cytokine-stimulated microglia. *Life Sci* 86:315-321.
- Katsiki M, Chondrogianni N, Chinou I, Rivett AJ, Gonos ES (2007) The olive constituent oleuropein exhibits proteasome stimulatory properties in vitro and confers life span extension of human embryonic fibroblasts. *Rejuvenation Res* 10:157-172.
- Katz MJ, Lipton RB, Hall CB, Zimmerman ME, Sanders AE, Verghese J, Dickson DW, Derby CA (2012) Age-specific and sex-specific prevalence and incidence of mild cognitive impairment, dementia, and Alzheimer dementia in blacks and whites: a report from the Einstein Aging Study. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 26:335-343.
- Kawabata K, Kawai Y, Terao J (2010) Suppressive effect of quercetin on acute stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis response in Wistar rats. *J Nutr Biochem* 21:374-380.
- Kawahara M (2010) Neurotoxicity of beta-amyloid protein: oligomerization, channel formation, and calcium dyshomeostasis. *Curr Pharm Des* 16:2779-2789.
- Keller JN, Hanni KB, Markesbery WR (2000a) Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 75:436-439.
- Keller JN, Hanni KB, Markesbery WR (2000c) Possible involvement of proteasome inhibition in aging: implications for oxidative stress. *Mech Ageing Dev* 113:61-70.
- Keller JN, Huang FF, Markesbery WR (2000b) Decreased levels of proteasome activity and proteasome expression in aging spinal cord. *Neuroscience* 98:149-156.

- Keller JN, Schmitt FA, Scheff SW, Ding Q, Chen Q, Butterfield DA, Markesbery WR (2005) Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. *Neurology* 64:1152-1156.
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A (2011) Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91:461-553.
- Kharrazi H, Vaisi-Raygani A, Rahimi Z, Tavilani H, Aminian M, Pourmotabbed T (2008) Association between enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense mechanism with apolipoprotein E genotypes in Alzheimer disease. *Clin Biochem* 41:932-936.
- Kim SM, Song J, Kim S, Han C, Park MH, Koh Y, Jo SA, Kim YY (2011) Identification of peripheral inflammatory markers between normal control and Alzheimer's disease. *BMC Neurol* 11:51.
- Kim TS, Pae CU, Yoon SJ, Jang WY, Lee NJ, Kim JJ, Lee SJ, Lee C, Paik IH, Lee CU (2006) Decreased plasma antioxidants in patients with Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 21:344-348.
- Kim TW, Pettingell WH, Jung YK, Kovacs DM, Tanzi RE (1997) Alternative cleavage of Alzheimer-associated presenilins during apoptosis by a caspase-3 family protease. *Science* 277:373-376.
- Kiyota T, Yamamoto M, Xiong H, Lambert MP, Klein WL, Gendelman HE, Ransohoff RM, Ikezu T (2009) CCL2 accelerates microglia-mediated A β oligomer formation and progression of neurocognitive dysfunction. *PLoS One* 4:e6197.
- Klafki HW, Staufenbiel M, Kornhuber J, Wiltfang J (2006) Therapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Brain* 129:2840-2855.
- Klaiman G, Petzke TL, Hammond J, Leblanc AC (2008) Targets of caspase-6 activity in human neurons and Alzheimer disease. *Mol Cell Proteomics* 7:1541-1555.
- Kling B, Bucherl D, Palatzky P, Matysik FM, Decker M, Wegener J, Heilmann J (2014) Flavonoids, flavonoid metabolites, and phenolic acids inhibit oxidative stress in the neuronal cell line HT-22 monitored by ECIS and MTT assay: a comparative study. *J Nat Prod* 77:446-454.
- Koda T, Kuroda Y, Imai H (2009) Rutin supplementation in the diet has protective effects against toxicant-induced hippocampal injury by suppression of microglial activation and pro-inflammatory cytokines: protective effect of rutin against toxicant-induced hippocampal injury. *Cell Mol Neurobiol* 29:523-531.
- Koistinaho M, Lin S, Wu X, Esterman M, Koger D, Hanson J, Higgs R, Liu F, Malkani S, Bales KR, Paul SM (2004) Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nat Med* 10:719-726.
- Komatsu H, Liu L, Murray IV, Axelsen PH (2007) A mechanistic link between oxidative stress and membrane mediated amyloidogenesis revealed by infrared spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1768:1913-1922.
- Kopan R, Ilagan MX (2009) The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137:216-233.
- Kopito RR, Sitia R (2000) Aggresomes and Russell bodies. Symptoms of cellular indigestion? *EMBO Rep* 1:225-231.
- Kosenko EA, Solomadin IN, Reddy VP, Aliev G, Kaminsky YG (2013) Pathogenesis of Alzheimer Disease: Role of Oxidative Stress, Amyloid Beta Peptides, Systemic Ammonia and Erythrocyte Energy Metabolism. *CNS Neurol Disord Drug Targets*.
- Kozuka N, Itofusa R, Kudo Y, Morita M (2005) Lipopolysaccharide and proinflammatory cytokines require different astrocyte states to induce nitric oxide production. *J Neurosci Res* 82:717-728.
- Krikorian R, Nash TA, Shidler MD, Shukitt-Hale B, Joseph JA (2010a) Concord grape juice supplementation improves memory function in older adults with mild cognitive impairment. *Br J Nutr* 103:730-734.
- Krikorian R, Shidler MD, Nash TA, Kalt W, Vinqvist-Tymchuk MR, Shukitt-Hale B, Joseph JA (2010b) Blueberry supplementation improves memory in older adults. *J Agric Food Chem* 58:3996-4000.
- Ksiezak-Reding H, Ho L, Santa-Maria I, Diaz-Ruiz C, Wang J, Pasinetti GM (2011) Ultrastructural alterations of Alzheimer's disease paired helical filaments by grape seed-derived polyphenols. *Neurobiol Aging* 33:1427-1439.

- Kumar A, Rinwa P, Dhar H (2014) Possible nitric oxide modulation in the protective effects of rutin against experimental head trauma-induced cognitive deficits: behavioral, biochemical, and molecular correlates. *J Surg Res* 188:268-279.
- Kumar A, Schapiro MB, Grady C, Haxby JV, Wagner E, Salerno JA, Friedland RP, Rapoport SI (1991) High-resolution PET studies in Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* 4:35-46.
- Kuntner C, Kesner AL, Bauer M, Kremslehner R, Wanek T, Mandler M, Karch R, Stanek J, Wolf T, Muller M, Langer O (2009) Limitations of small animal PET imaging with [18F]FDNP and FDG for quantitative studies in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Imaging Biol* 11:236-240.
- Ladiwala AR, Mora-Pale M, Lin JC, Bale SS, Fishman ZS, Dordick JS, Tessier PM. (2011) Polyphenolic glycosides and aglycones utilize opposing pathways to selectively remodel and inactivate toxic oligomers of amyloid beta. *Chembiochem* 12:1749-1758.
- LaFerla FM, Green KN, Oddo S (2007) Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 8:499-509.
- Lambert JC et al. (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41:1094-1099.
- Langui D, Girardot N, El Hachimi KH, Allinquant B, Blanchard V, Pradier L, Duyckaerts C (2004) Subcellular topography of neuronal Abeta peptide in APPxPS1 transgenic mice. *Am J Pathol* 165:1465-1477.
- Larner AJ (2011) Cholinesterase inhibitors: beyond Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother* 10:1699-1705.
- Larson ME, Lesne SE (2012) Soluble Abeta oligomer production and toxicity. *J Neurochem* 120 Suppl 1:125-139.
- Lauderback CM, Hackett JM, Huang FF, Keller JN, Szweda LI, Markesbery WR, Butterfield DA (2001) The glial glutamate transporter, GLT-1, is oxidatively modified by 4-hydroxy-2-nonenal in the Alzheimer's disease brain: the role of Abeta1-42. *J Neurochem* 78:413-416.
- Le Gall SM, Bobe P, Reiss K, Horiuchi K, Niu XD, Lundell D, Gibb DR, Conrad D, Saftig P, Blobel CP (2009) ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha. *Mol Biol Cell* 20:1785-1794.
- LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5:227-231.
- Lee JH, Cheon YH, Woo RS, Song DY, Moon C, Baik TK (2012a) Evidence of early involvement of apoptosis inducing factor-induced neuronal death in Alzheimer brain. *Anat Cell Biol* 45:26-37.
- Lee S, Shea TB (2012) Caspase-mediated truncation of tau potentiates aggregation. *Int J Alzheimers Dis* 2012:731063.
- Lee W, Ku SK, Bae JS (2012b) Barrier protective effects of rutin in LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol* 50:3048-3055.
- Lesne S, Kotilinek L, Ashe KH (2008) Plaque-bearing mice with reduced levels of oligomeric amyloid-beta assemblies have intact memory function. *Neuroscience* 151:745-749.
- Levites Y, Weinreb O, Maor G, Youdim MB, Mandel S (2001) Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. *J Neurochem* 78:1073-1082.
- Li C, Zhao R, Gao K, Wei Z, Yin MY, Lau LT, Chui D, Hoi Yu AC (2011) Astrocytes: implications for neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 8:67-80.
- Li Q, Zhao HF, Zhang ZF, Liu ZG, Pei XR, Wang JB, Li Y (2009) Long-term green tea catechin administration prevents spatial learning and memory impairment in senescence-accelerated mouse prone-8 mice by decreasing Abeta1-42 oligomers and upregulating synaptic plasticity-related proteins in the hippocampus. *Neuroscience* 163:741-749.

- Liao W, Jin G, Zhao M, Yang H (2013) The effect of genistein on the content and activity of alpha- and beta-secretase and protein kinase C in Abeta-injured hippocampal neurons. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 112:182-185.
- Lieberman LA, Hunter CA (2002) Regulatory pathways involved in the infection-induced production of IFN-gamma by NK cells. *Microbes Infect* 4:1531-1538.
- Lim GP, Chu T, Yang F, Beech W, Frautschy SA, Cole GM (2001) The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J Neurosci* 21:8370-8377.
- Liu Q, Smith MA, Avila J, DeBernardis J, Kansal M, Takeda A, Zhu X, Nunomura A, Honda K, Moreira PI, Oliveira CR, Santos MS, Shimohama S, Aliev G, de la Torre J, Ghanbari HA, Siedlak SL, Harris PL, Sayre LM, Perry G (2005) Alzheimer-specific epitopes of tau represent lipid peroxidation-induced conformations. *Free Radic Biol Med* 38:746-754.
- Liu YQ, Xin TR, Liang JJ, Wang WM, Zhang YY (2011) Memory performance, brain excitatory amino acid and acetylcholinesterase activity of chronically aluminum exposed mice in response to soy isoflavones treatment. *Phytother Res* 24:1451-1456.
- Lo D, Grossberg GT (2011) Use of memantine for the treatment of dementia. *Expert Rev Neurother* 11:1359-1370.
- Loetscher H, Deuschle U, Brockhaus M, Reinhardt D, Nelboeck P, Mous J, Grunberg J, Haass C, Jacobsen H (1997) Presenilins are processed by caspase-type proteases. *J Biol Chem* 272:20655-20659.
- Lopes JP, Oliveira CR, Agostinho P (2010) Neurodegeneration in an Abeta-induced model of Alzheimer's disease: the role of Cdk5. *Aging Cell* 9:64-77.
- Lopez JR, Lyckman A, Oddo S, Laferla FM, Querfurth HW, Shtifman A (2008) Increased intraneuronal resting [Ca²⁺] in adult Alzheimer's disease mice. *J Neurochem* 105:262-271.
- Loscalzo LM, Wasowski C, Paladini AC, Marder M (2008) Opioid receptors are involved in the sedative and antinociceptive effects of hesperidin as well as in its potentiation with benzodiazepines. *Eur J Pharmacol* 580:306-313.
- Lou H, Fan P, Perez RG (2011) Neuroprotective effects of linarin through activation of the PI3K/Akt pathway in amyloid-beta-induced neuronal cell death. *Bioorg Med Chem* 19:4021-4027.
- Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, Markesbery WR (1995) Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology* 45:1594-1601.
- Lovell MA, Markesbery WR (2007) Oxidative damage in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 85:3036-3040.
- Lu DC, Soriano S, Bredesen DE, Koo EH (2003) Caspase cleavage of the amyloid precursor protein modulates amyloid beta-protein toxicity. *J Neurochem* 87:733-741.
- Lu J, Wu DM, Zheng YL, Hu B, Zhang ZF, Shan Q, Zheng ZH, Liu CM, Wang YJ (2010) Quercetin activates AMP-activated protein kinase by reducing PP2C expression protecting old mouse brain against high cholesterol-induced neurotoxicity. *J Pathol* 222:199-212.
- Lublin AL, Gandy S Amyloid-beta oligomers: possible roles as key neurotoxins in Alzheimer's Disease. *Mt Sinai J Med* 77:43-49.
- Luchsinger JA, Cheng D, Tang MX, Schupf N, Mayeux R (2011) Central obesity in the elderly is related to late-onset Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 26:101-105.
- Luo F, Rustay NR, Ebert U, Hradil VP, Cole TB, Llano DA, Day M. (2012). Characterization of 7- and 19-month-old Tg2576 mice using multimodal in vivo imaging: limitations as a translatable model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 33(5); 933-944.
- Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Khan S, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, Gong Y, Martin L, Louis JC, Yan Q, Richards WG, Citron M, Vassar R (2001) Mice deficient in BACE, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci* 4:231-232.

- Macready AL, George TW, Chong MF, Alimbetov DS, Jin Y, Vidal A, Spencer JP, Kennedy OB, Tuohy KM, Minihane AM, Gordon MH, Lovegrove JA (2014) Flavonoid-rich fruit and vegetables improve microvascular reactivity and inflammatory status in men at risk of cardiovascular disease--FLAVURS: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 99:479-489.
- Maeda J, Ji B, Irie T, Tomiyama T, Maruyama M, Okauchi T, Staufenbiel M, Iwata N, Ono M, Saido TC, Suzuki K, Mori H, Higuchi M, Suhara T (2007) Longitudinal, quantitative assessment of amyloid, neuroinflammation, and anti-amyloid treatment in a living mouse model of Alzheimer's disease enabled by positron emission tomography. *J Neurosci* 27:10957-10968.
- Maher P (2008) The flavonoid fisetin promotes nerve cell survival from trophic factor withdrawal by enhancement of proteasome activity. *Arch Biochem Biophys* 476:139-144.
- Maher P, Akaishi T, Abe K (2006) Flavonoid fisetin promotes ERK-dependent long-term potentiation and enhances memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:16568-16573.
- Manczak M, Anekonda TS, Henson E, Park BS, Quinn J, Reddy PH (2006) Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum Mol Genet* 15:1437-1449.
- Mandel S, Amit T, Bar-Am O, Youdim MB (2007) Iron dysregulation in Alzheimer's disease: multimodal brain permeable iron chelating drugs, possessing neuroprotective-neurorescue and amyloid precursor protein-processing regulatory activities as therapeutic agents. *Prog Neurobiol* 82:348-360.
- Mandel S, Amit T, Reznichenko L, Weinreb O, Youdim MB (2006) Green tea catechins as brain-permeable, natural iron chelators-antioxidants for the treatment of neurodegenerative disorders. *Mol Nutr Food Res* 50:229-234.
- Mandel SA, Amit T, Kalfon L, Reznichenko L, Weinreb O, Youdim MB (2008) Cell signaling pathways and iron chelation in the neurorestorative activity of green tea polyphenols: special reference to epigallocatechin gallate (EGCG). *J Alzheimers Dis* 15:211-222.
- Mark RJ, Lovell MA, Markesbery WR, Uchida K, Mattson MP (1997) A role for 4-hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by amyloid beta-peptide. *J Neurochem* 68:255-264.
- Markesbery WR, Lovell MA (2007) Damage to lipids, proteins, DNA, and RNA in mild cognitive impairment. *Arch Neurol* 64:954-956.
- Marklund S, Marklund G (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47:469-474.
- Martin-Aragon S, Bermejo-Bescos P, Benedi J, Felici E, Gil P, Ribera JM, Villar AM (2009) Metalloproteinase's activity and oxidative stress in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 34:373-378.
- Martinez MC, Fernandez SP, Loscalzo LM, Wasowski C, Paladini AC, Marder M, Medina JH, Viola H (2009) Hesperidin, a flavonoid glycoside with sedative effect, decreases brain pERK1/2 levels in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 92:291-296.
- Martorana A, Esposito Z, Koch G (2010) Beyond the cholinergic hypothesis: do current drugs work in Alzheimer's disease? *CNS Neurosci Ther* 16:235-245.
- Maruszak A, Zekanowski C (2011) Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35:320-330.
- Massey V, Williams CH, Jr. (1965) On the reaction mechanism of yeast glutathione reductase. *J Biol Chem* 240:4470-4480.
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4245-4249.
- Matsui T, Ramasamy K, Ingelsson M, Fukumoto H, Conrad C, Frosch MP, Irizarry MC, Yuan J, Hyman BT (2006) Coordinated expression of caspase 8, 3 and 7 mRNA in temporal cortex of Alzheimer disease: relationship to formic acid extractable abeta42 levels. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:508-515.

- Matsuzaki K, Miyazaki K, Sakai S, Yawo H, Nakata N, Moriguchi S, Fukunaga K, Yokosuka A, Sashida Y, Mimaki Y, Yamakuni T, Ohizumi Y (2008) Nobiletin, a citrus flavonoid with neurotrophic action, augments protein kinase A-mediated phosphorylation of the AMPA receptor subunit, GluR1, and the postsynaptic receptor response to glutamate in murine hippocampus. *Eur J Pharmacol* 578:194-200.
- Matsuzaki K, Yamakuni T, Hashimoto M, Haque AM, Shido O, Mimaki Y, Sashida Y, Ohizumi Y (2006) Nobiletin restoring beta-amyloid-impaired CREB phosphorylation rescues memory deterioration in Alzheimer's disease model rats. *Neurosci Lett* 400:230-234.
- Mattson MP (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430:631-639.
- Mattson MP (2008) Hormesis defined. *Ageing Res Rev* 7:1-7.
- Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE (1992) beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci* 12:376-389.
- Mattson MP, Lovell MA, Furukawa K, Markesbery WR (1995) Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca^{2+} concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. *J Neurochem* 65:1740-1751.
- Mattsson N et al. (2009) CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *JAMA* 302:385-393.
- Maurer AP, Cowen SL, Burke SN, Barnes CA, McNaughton BL (2006) Organization of hippocampal cell assemblies based on theta phase precession. *Hippocampus* 16:785-794.
- Mayeux R, Honig LS, Tang MX, Manly J, Stern Y, Schupf N, Mehta PD (2003) Plasma A[β]40 and A[β]42 and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk. *Neurology* 61:1185-1190.
- McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244:6049-6055.
- McCullough ML, Peterson JJ, Patel R, Jacques PF, Shah R, Dwyer JT (2012) Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of US adults. *Am J Clin Nutr* 95:454-464.
- McIntosh LJ, Trush MA, Troncoso JC (1997) Increased susceptibility of Alzheimer's disease temporal cortex to oxygen free radical-mediated processes. *Free Radic Biol Med* 23:183-190.
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34:939-944.
- McNaught KS, Bjorklund LM, Belizaire R, Isacson O, Jenner P, Olanow CW (2002) Proteasome inhibition causes nigral degeneration with inclusion bodies in rats. *Neuroreport* 13:1437-1441.
- Meeusen R (2014) Exercise, nutrition and the brain. *Sports Med* 44 Suppl 1:S47-56.
- Meister A (1988) Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 263:17205-17208.
- Menendez-Gonzalez M, Perez-Pinera P, Martinez-Rivera M, Calatayud MT, Blazquez Menes B (2005) APP processing and the APP-KPI domain involvement in the amyloid cascade. *Neurodegener Dis* 2:277-283.
- Meotti FC, Posser T, Missau FC, Pizzolatti MG, Leal RB, Santos AR (2007) Involvement of p38MAPK on the antinociceptive action of myricitrin in mice. *Biochem Pharmacol* 74:924-931.
- Meraz-Rios MA, Lira-De Leon KI, Campos-Pena V, De Anda-Hernandez MA, Mena-Lopez R (2010) Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 112:1353-1367.
- Metcalfe MJ, Figueiredo-Pereira ME (2010) Relationship between tau pathology and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med* 77:50-58.
- Minghetti L, Greco A, Puopolo M, Combrinck M, Warden D, Smith AD (2006) Peripheral reductive capacity is associated with cognitive performance and survival in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 3:4.

- Minoshima S, Frey KA, Foster NL, Kuhl DE (1995) Preserved pontine glucose metabolism in Alzheimer disease: a reference region for functional brain image (PET) analysis. *J Comput Assist Tomogr* 19:541-547.
- Minoshima S, Frey KA, Kuhl DE (1998) Cerebellar metabolic reduction in Alzheimer's disease and data normalization. *J Nucl Med* 39:374-376.
- Mizushima N, Klionsky DJ (2007) Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu Rev Nutr* 27:19-40.
- Mohanta TK, Tamboli Y, Zubaidha PK (2014) Phytochemical and medicinal importance of Ginkgo biloba L. *Nat Prod Res* 28:746-752.
- Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW (1989) The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29:365-402.
- Moraes MS, Costa PE, Batista WL, Paschoalin T, Curcio MF, Borges RE, Taha MO, Fonseca FV, Stern A, Monteiro HP (2014) Endothelium-derived nitric oxide (NO) activates the NO-epidermal growth factor receptor-mediated signaling pathway in bradykinin-stimulated angiogenesis. *Arch Biochem Biophys*.
- Mori T, Rezai-Zadeh K, Koyama N, Arendash GW, Yamaguchi H, Kakuda N, Horikoshi-Sakuraba Y, Tan J, Town T (2012) Tannic acid is a natural beta-secretase inhibitor that prevents cognitive impairment and mitigates Alzheimer-like pathology in transgenic mice. *J Biol Chem* 287:6912-6927.
- Morihara T, Teter B, Yang F, Lim GP, Boudinot S, Boudinot FD, Frautschy SA, Cole GM (2005) Ibuprofen suppresses interleukin-1 β induction of pro-amyloidogenic α 1-antichymotrypsin to ameliorate beta-amyloid (A β) pathology in Alzheimer's models. *Neuropsychopharmacology* 30:1111-1120.
- Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Titani K, Ihara Y (1993) Ubiquitin is conjugated with amino-terminally processed tau in paired helical filaments. *Neuron* 10:1151-1160.
- Morishima-Kawashima M, Ihara Y (2002) Alzheimer's disease: beta-Amyloid protein and tau. *J Neurosci Res* 70:392-401.
- Morishima-Kawashima M, Oshima N, Ogata H, Yamaguchi H, Yoshimura M, Sugihara S, Ihara Y (2000) Effect of apolipoprotein E allele epsilon4 on the initial phase of amyloid beta-protein accumulation in the human brain. *Am J Pathol* 157:2093-2099.
- Morley JE, Armbrecht HJ, Farr SA, Kumar VB (2012) The senescence accelerated mouse (SAMP8) as a model for oxidative stress and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1822:650-656.
- Mosconi L (2005) Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease. FDG-PET studies in MCI and AD. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32:486-510.
- Mota KS, Dias GE, Pinto ME, Luiz-Ferreira A, Souza-Brito AR, Hiruma-Lima CA, Barbosa-Filho JM, Batista LM (2009) Flavonoids with gastroprotective activity. *Molecules* 14:979-1012.
- Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L (2000) High-level neuronal expression of A β 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* 20:4050-4058.
- Muresan V, Muresan Z (2009) Is abnormal axonal transport a cause, a contributing factor or a consequence of the neuronal pathology in Alzheimer's disease? *Future Neurol* 4:761-773.
- Myhrstad MC, Carlsen H, Nordstrom O, Blomhoff R, Moskaug JO (2002) Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytic subunit promoter. *Free Radic Biol Med* 32:386-393.
- Nagase H, Omae N, Omori A, Nakagawasai O, Tadano T, Yokosuka A, Sashida Y, Mimaki Y, Yamakuni T, Ohizumi Y (2005a) Nobiletin and its related flavonoids with CRE-dependent transcription-stimulating and neuritegenic activities. *Biochem Biophys Res Commun* 337:1330-1336.

- Nagase H, Yamakuni T, Matsuzaki K, Maruyama Y, Kasahara J, Hinohara Y, Kondo S, Mimaki Y, Sashida Y, Tank AW, Fukunaga K, Ohizumi Y (2005b) Mechanism of neurotrophic action of nobiletin in PC12D cells. *Biochemistry* 44:13683-13691.
- Naidu PS, Singh A, Joshi D, Kulkarni SK (2003) Possible mechanisms of action in quercetin reversal of morphine tolerance and dependence. *Addict Biol* 8:327-336.
- Naj AC et al. (2011) Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet* 43:436-441.
- Nakajima A, Aoyama Y, Nguyen TT, Shin EJ, Kim HC, Yamada S, Nakai T, Nagai T, Yokosuka A, Mimaki Y, Ohizumi Y, Yamada K (2013) Nobiletin, a citrus flavonoid, ameliorates cognitive impairment, oxidative burden, and hyperphosphorylation of tau in senescence-accelerated mouse. *Behav Brain Res* 250:351-360.
- Nakajima A, Yamakuni T, Haraguchi M, Omae N, Song SY, Kato C, Nakagawasai O, Tadano T, Yokosuka A, Mimaki Y, Sashida Y, Ohizumi Y (2007) Nobiletin, a citrus flavonoid that improves memory impairment, rescues bullectomy-induced cholinergic neurodegeneration in mice. *J Pharmacol Sci* 105:122-126.
- Naoi M, Maruyama W, Yi H, Inaba K, Akao Y, Shamoto-Nagai M (2009) Mitochondria in neurodegenerative disorders: regulation of the redox state and death signaling leading to neuronal death and survival. *J Neural Transm* 116:1371-1381.
- Nassiri-Asl M, Shariati-Rad S, Zamansoltani F (2008) Anticonvulsive effects of intracerebroventricular administration of rutin in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32:989-993.
- Nenaah G (2013) Antimicrobial activity of *Calotropis procera* Ait. (Asclepiadaceae) and isolation of four flavonoid glycosides as the active constituents. *World J Microbiol Biotechnol* 29:1255-1262.
- Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary DD, Tessier-Lavigne M (2009) APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* 457:981-989.
- Nishida S, Satoh H (2009) Possible Involvement of Ca Activated K Channels, SK Channel, in the Quercetin-Induced Vasodilatation. *Korean J Physiol Pharmacol* 13:361-365.
- Nishimura M, Satoh M, Matsushita K, Nomura F (2014) How proteomic ApoE serotyping could impact Alzheimer's disease risk assessment: genetic testing by proteomics. *Expert Rev Proteomics*:1-3.
- Niu YL, Zhang WJ, Wu P, Liu B, Sun GT, Yu DM, Deng JB Expression of the apoptosis-related proteins caspase-3 and NF-kappaB in the hippocampus of Tg2576 mice. *Neurosci Bull* 26:37-46.
- Niwa K, Kazama K, Younkin SG, Carlson GA, Iadecola C (2002) Alterations in cerebral blood flow and glucose utilization in mice overexpressing the amyloid precursor protein. *Neurobiol Dis* 9:61-68.
- Nordberg A (2008) Amyloid plaque imaging in vivo: current achievement and future prospects. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35 Suppl 1:S46-50.
- Norfray JF, Provenzale JM (2004) Alzheimer's disease: neuropathologic findings and recent advances in imaging. *AJR Am J Roentgenol* 182:3-13.
- Nunomura A, Chiba S (2000) Avoidance of Apoptosis in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2:59-60.
- Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L, Berry R, Vassar R (2006) Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci* 26:10129-10140.
- Obregon DF, Rezai-Zadeh K, Bai Y, Sun N, Hou H, Ehrhart J, Zeng J, Mori T, Arendash GW, Shytle D, Town T, Tan J (2006) ADAM10 activation is required for green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 281:16419-16427.
- Obulesu M, Jhansilakshmi M (2013) Neuroinflammation in Alzheimer's disease: an understanding of physiology and pathology. *Int J Neurosci*.
- Obulesu M, Venu R, Somashekhar R (2011) Tau mediated neurodegeneration: an insight into Alzheimer's disease pathology. *Neurochem Res* 36:1329-1335.
- Oddo S (2008) The ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 12:363-373.

- Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM (2003a) Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 24:1063-1070.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003b) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39:409-421.
- Ognibene E, Bovicelli P, Adriani W, Saso L, Laviola G (2008) Behavioral effects of 6-bromoflavanone and 5-methoxy-6,8-dibromoflavanone as anxiolytic compounds. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32:128-134.
- Okuyama S, Shimada N, Kaji M, Morita M, Miyoshi K, Minami S, Amakura Y, Yoshimura M, Yoshida T, Watanabe S, Nakajima M, Furukawa Y (2012) Heptamethoxyflavone, a citrus flavonoid, enhances brain-derived neurotrophic factor production and neurogenesis in the hippocampus following cerebral global ischemia in mice. *Neurosci Lett* 528:190-195.
- O'Neill LA, Dinarello CA (2000) The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunol Today* 21:206-209.
- Ono K, Condron MM, Ho L, Wang J, Zhao W, Pasinetti GM, Teplow DB (2008) Effects of grape seed-derived polyphenols on amyloid beta-protein self-assembly and cytotoxicity. *J Biol Chem* 283:32176-32187.
- Ono K, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M (2004) Anti-amyloidogenic activity of tannic acid and its activity to destabilize Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1690:193-202.
- Ono K, Yoshiike Y, Takashima A, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M (2003) Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 87:172-181.
- Onozuka H, Nakajima A, Matsuzaki K, Shin RW, Ogino K, Saigusa D, Tetsu N, Yokosuka A, Sashida Y, Mimaki Y, Yamakuni T, Ohizumi Y (2008) Nobiletin, a citrus flavonoid, improves memory impairment and Abeta pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther* 326:739-744.
- Opazo C, Huang X, Cherny RA, Moir RD, Roher AE, White AR, Cappai R, Masters CL, Tanzi RE, Inestrosa NC, Bush AI (2002) Metalloenzyme-like activity of Alzheimer's disease beta-amyloid. Cu-dependent catalytic conversion of dopamine, cholesterol, and biological reducing agents to neurotoxic H₂O₂. *J Biol Chem* 277:40302-40308.
- Ozcankaya R, Delibas N (2002) Malondialdehyde, superoxide dismutase, melatonin, iron, copper, and zinc blood concentrations in patients with Alzheimer disease: cross-sectional study. *Croat Med J* 43:28-32.
- Padurariu M, Ciobica A, Hritcu L, Stoica B, Bild W, Stefanescu C (2010) Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 469:6-10.
- Pallauf K, Rimbach G (2013) Autophagy, polyphenols and healthy ageing. *Ageing Res Rev* 12:237-252.
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH (2000) Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425:479-494.
- Park H, Yoo JS, Kim JY, Hwang BY, Han JS, Yeon SW, Kang JH (2014) Anti-amyloidogenic effects of ID1201, the ethanolic extract of the fruits of *Melia toosendan*, through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Environ Toxicol Pharmacol* 37:513-520.
- Park SA, Shaked GM, Bredesen DE, Koo EH (2009) Mechanism of cytotoxicity mediated by the C31 fragment of the amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun* 388:450-455.
- Pasquini LA, Besio Moreno M, Adamo AM, Pasquini JM, Soto EF (2000) Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, induces apoptosis and activates caspase-3 in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* 59:601-611.
- Patil CS, Singh VP, Satyanarayan PS, Jain NK, Singh A, Kulkarni SK (2003) Protective effect of flavonoids against aging- and lipopolysaccharide-induced cognitive impairment in mice. *Pharmacology* 69:59-67.

- Perez-Tur J (2001) [Presenilins in the genesis of Alzheimer's disease]. *Rev Neurol* 33:967-972.
- Phelps ME (2000) Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9226-9233.
- Pimplikar SW (2009) Reassessing the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 41:1261-1268.
- Pompl PN, Yemul S, Xiang Z, Ho L, Haroutunian V, Purohit D, Mohs R, Pasinetti GM (2003) Caspase gene expression in the brain as a function of the clinical progression of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 60:369-376.
- Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, Prinzen C, Endres K, Hiemke C, Blessing M, Flamez P, Dequenue A, Godaux E, van Leuven F, Fahrenholz F (2004) A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 113:1456-1464.
- Pradhan SC, Girish C (2006) Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian J Med Res* 124:491-504.
- Prahalathan P, Saravanakumar M, Raja B (2012) The flavonoid morin restores blood pressure and lipid metabolism in DOCA-salt hypertensive rats. *Redox Rep* 17:167-175.
- Pratico D, Uryu K, Leight S, Trojanowski JQ, Lee VM (2001) Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *J Neurosci* 21:4183-4187.
- Price JL, Morris JC (1999) Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 45:358-368.
- Pritchard SM, Dolan PJ, Vitkus A, Johnson GV (2011) The toxicity of tau in Alzheimer disease: turnover, targets and potential therapeutics. *J Cell Mol Med* 15:1621-1635.
- Pu F, Mishima K, Irie K, Motohashi K, Tanaka Y, Orito K, Egawa T, Kitamura Y, Egashira N, Iwasaki K, Fujiwara M (2007) Neuroprotective effects of quercetin and rutin on spatial memory impairment in an 8-arm radial maze task and neuronal death induced by repeated cerebral ischemia in rats. *J Pharmacol Sci* 104:329-334.
- Qiu JH, Asai A, Chi S, Saito N, Hamada H, Kirino T (2000) Proteasome inhibitors induce cytochrome c-caspase-3-like protease-mediated apoptosis in cultured cortical neurons. *J Neurosci* 20:259-265.
- Qu J, Zhou Q, Du Y, Zhang W, Bai M, Zhang Z, Xi Y, Li Z, Miao J (2014) Rutin protects against cognitive deficits and brain damage in rats with chronic cerebral hypoperfusion. *Br J Pharmacol*.
- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 266:4244-4250.
- Raina AK, Zhu X, Shimohama S, Perry G, Smith MA (2003) Tipping the apoptotic balance in Alzheimer's disease: the abortosis concept. *Cell Biochem Biophys* 39:249-255.
- Ramos CA, Bowman TA, Boles NC, Merchant AA, Zheng Y, Parra I, Fuqua SA, Shaw CA, Goodell MA (2006) Evidence for diversity in transcriptional profiles of single hematopoietic stem cells. *PLoS Genet* 2:e159.
- Ransohoff RM, Brown MA (2012) Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest* 122:1164-1171.
- Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP, Ferreira A (2002) Tau is essential to beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6364-6369.
- Rasola A, Bernardi P (2011) Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium* 50:222-233.
- Raucy JL (2003) Regulation of CYP3A4 expression in human hepatocytes by pharmaceuticals and natural products. *Drug Metab Dispos* 31:533-539.
- Raynaud F, Marcilhac A (2006) Implication of calpain in neuronal apoptosis. A possible regulation of Alzheimer's disease. *FEBS J* 273:3437-3443.
- Reddy PH (2009) Amyloid beta, mitochondrial structural and functional dynamics in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 218:286-292.

- Reed TT, Pierce WM, Markesbery WR, Butterfield DA (2009) Proteomic identification of HNE-bound proteins in early Alzheimer disease: Insights into the role of lipid peroxidation in the progression of AD. *Brain Res* 1274:66-76.
- Reiman EM, Caselli RJ (1999) Alzheimer's disease. *Maturitas* 31:185-200.
- Reiman EM, Chen K, Alexander GE, Caselli RJ, Bandy D, Osborne D, Saunders AM, Hardy J (2005) Correlations between apolipoprotein E epsilon4 gene dose and brain-imaging measurements of regional hypometabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8299-8302.
- Reinhard C, Hebert SS, De Strooper B (2005) The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function. *EMBO J* 24:3996-4006.
- Reinheckel T, Grune T, Davies KJ (2000) The measurement of protein degradation in response to oxidative stress. *Methods Mol Biol* 99:49-60.
- Reiss AB, Voloshyna I (2012) Regulation of cerebral cholesterol metabolism in Alzheimer disease. *J Investig Med* 60:576-582.
- Rendeiro C, Vauzour D, Kean RJ, Butler LT, Rattray M, Spencer JP, Williams CM (2012) Blueberry supplementation induces spatial memory improvements and region-specific regulation of hippocampal BDNF mRNA expression in young rats. *Psychopharmacology (Berl)* 223:319-330.
- Resende R, Moreira PI, Proenca T, Deshpande A, Busciglio J, Pereira C, Oliveira CR (2008) Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 44:2051-2057.
- Rezai-Zadeh K, Arendash GW, Hou H, Fernandez F, Jensen M, Runfeldt M, Shytle RD, Tan J (2008) Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces beta-amyloid mediated cognitive impairment and modulates tau pathology in Alzheimer transgenic mice. *Brain Res* 1214:177-187.
- Rezai-Zadeh K, Shytle D, Sun N, Mori T, Hou H, Jeanniton D, Ehrhart J, Townsend K, Zeng J, Morgan D, Hardy J, Town T, Tan J (2005) Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modulates amyloid precursor protein cleavage and reduces cerebral amyloidosis in Alzheimer transgenic mice. *J Neurosci* 25:8807-8814.
- Riascos D, de Leon D, Baker-Nigh A, Nicholas A, Yukhananov R, Bu J, Wu CK, Geula C (2011) Age-related loss of calcium buffering and selective neuronal vulnerability in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 122:565-576.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20:933-956.
- Richetti SK, Blank M, Capiotti KM, Piato AL, Bogo MR, Vianna MR, Bonan CD (2011) Quercetin and rutin prevent scopolamine-induced memory impairment in zebrafish. *Behav Brain Res* 217:10-15.
- Rinaldi P, Polidori MC, Metastasio A, Mariani E, Mattioli P, Cherubini A, Catani M, Cecchetti R, Senin U, Mecocci P (2003) Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 24:915-919.
- Roberds SL et al. (2001) BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Hum Mol Genet* 10:1317-1324.
- Roberson ED, Scearce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, Gerstein H, Yu GQ, Mucke L (2007) Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 316:750-754.
- Roberts BR, Ryan TM, Bush AI, Masters CL, Duce JA (2012) The role of metallobiology and amyloid-beta peptides in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 120 Suppl 1:149-166.
- Rocchi A, Pellegrini S, Siciliano G, Murri L (2003) Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. *Brain Res Bull* 61:1-24.
- Roe CM, Mintun MA, D'Angelo G, Xiong C, Grant EA, Morris JC (2008) Alzheimer disease and cognitive reserve: variation of education effect with carbon 11-labeled Pittsburgh Compound B uptake. *Arch Neurol* 65:1467-1471.

- Rohan de Silva HA, Jen A, Wickenden C, Jen LS, Wilkinson SL, Patel AJ (1997) Cell-specific expression of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs and proteins in neurons and astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 47:147-156.
- Rohn TT, Head E (2008) Caspase activation in Alzheimer's disease: early to rise and late to bed. *Rev Neurosci* 19:383-393.
- Rohn TT, Rissman RA, Davis MC, Kim YE, Cotman CW, Head E (2002) Caspase-9 activation and caspase cleavage of tau in the Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Dis* 11:341-354.
- Roselli F, Tartaglione B, Federico F, Lepore V, Defazio G, Livrea P (2009) Rate of MMSE score change in Alzheimer's disease: influence of education and vascular risk factors. *Clin Neurol Neurosurg* 111:327-330.
- Rossi L, Squitti R, Pasqualetti P, Marchese E, Cassetta E, Forastiere E, Rotilio G, Rossini PM, Finazzi-Agro A (2002) Red blood cell copper, zinc superoxide dismutase activity is higher in Alzheimer's disease and is decreased by D-penicillamine. *Neurosci Lett* 329:137-140.
- Rossjohn J, Cappai R, Feil SC, Henry A, McKinsty WJ, Galatis D, Hesse L, Multhaup G, Beyreuther K, Masters CL, Parker MW (1999) Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein. *Nat Struct Biol* 6:327-331.
- Rusanen M, Kivipelto M, Quesenberry CP, Jr., Zhou J, Whitmer RA (2010) Heavy smoking in midlife and long-term risk of Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch Intern Med* 171:333-339.
- Saing T, Dick M, Nelson PT, Kim RC, Cribbs DH, Head E (2012) Frontal cortex neuropathology in dementia pugilistica. *J Neurotrauma* 29:1054-1070.
- Sakamoto S, Ishii K, Sasaki M, Hosaka K, Mori T, Matsui M, Hirono N, Mori E (2002) Differences in cerebral metabolic impairment between early and late onset types of Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 200:27-32.
- Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH (2005) Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 309:476-481.
- Sastre M, Klockgether T, Heneka MT (2006) Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *Int J Dev Neurosci* 24:167-176.
- Sastre M, Walter J, Gentleman SM (2008) Interactions between APP secretases and inflammatory mediators. *J Neuroinflammation* 5:25.
- Scarmeas N, Luchsinger JA, Brickman AM, Cosentino S, Schupf N, Xin-Tang M, Gu Y, Stern Y (2010) Physical activity and Alzheimer disease course. *Am J Geriatr Psychiatry* 19:471-481.
- Scheper W, Nijholt DA, Hoozemans JJ (2011) The unfolded protein response and proteostasis in Alzheimer disease: preferential activation of autophagy by endoplasmic reticulum stress. *Autophagy* 7:910-911.
- Schmued LC, Stowers CC, Scallet AC, Xu L (2005) Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res* 1035:24-31.
- Scholey AB, French SJ, Morris PJ, Kennedy DO, Milne AL, Haskell CF (2010) Consumption of cocoa flavanols results in acute improvements in mood and cognitive performance during sustained mental effort. *J Psychopharmacol* 24:1505-1514.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75:163-189.
- Schroeter H, Bahia P, Spencer JP, Sheppard O, Rattray M, Cadenas E, Rice-Evans C, Williams RJ (2007) (-)Epicatechin stimulates ERK-dependent cyclic AMP response element activity and up-regulates GluR2 in cortical neurons. *J Neurochem* 101:1596-1606.
- Selkoe DJ (1991a) Amyloid protein and Alzheimer's disease. *Sci Am* 265:68-71, 74-66, 78.
- Selkoe DJ (1991b) Alzheimer's disease. In the beginning. *Nature* 354:432-433.
- Selkoe DJ (2001a) Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11039-11041.

- Selkoe DJ (2001b) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81:741-766.
- Selkoe DJ (2008) Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res* 192:106-113.
- Selvaraj S, Krishnaswamy S, Devashya V, Sethuraman S, Krishnan UM (2014) Flavonoid-metal ion complexes: a novel class of therapeutic agents. *Med Res Rev* 34:677-702.
- Senft AP, Dalton TP, Shertzer HG (2000) Determining glutathione and glutathione disulfide using the fluorescence probe o-phthalaldehyde. *Anal Biochem* 280:80-86.
- Seppala TT, Nerg O, Koivisto AM, Rummukainen J, Puli L, Zetterberg H, Pyykko OT, Helisalmi S, Alafuzoff I, Hiltunen M, Jaaskelainen JE, Rinne J, Soininen H, Leinonen V, Herukka SK (2012) CSF biomarkers for Alzheimer disease correlate with cortical brain biopsy findings. *Neurology* 78:1568-1575.
- Seshadri S et al. (2010) Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA* 303:1832-1840.
- Sharma V, Mishra M, Ghosh S, Tewari R, Basu A, Seth P, Sen E (2007) Modulation of interleukin-1beta mediated inflammatory response in human astrocytes by flavonoids: implications in neuroprotection. *Brain Res Bull* 73:55-63.
- Shen J, Bronson RT, Chen DF, Xia W, Selkoe DJ, Tonegawa S (1997) Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell* 89:629-639.
- Shen J, Kelleher RJ, 3rd (2007) The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:403-409.
- Shimmyo Y, Kihara T, Akaike A, Niidome T, Sugimoto H (2008a) Epigallocatechin-3-gallate and curcumin suppress amyloid beta-induced beta-site APP cleaving enzyme-1 upregulation. *Neuroreport* 19:1329-1333.
- Shimmyo Y, Kihara T, Akaike A, Niidome T, Sugimoto H (2008b) Flavonols and flavones as BACE-1 inhibitors: structure-activity relationship in cell-free, cell-based and in silico studies reveal novel pharmacophore features. *Biochim Biophys Acta* 1780:819-825.
- Shimmyo Y, Kihara T, Akaike A, Niidome T, Sugimoto H (2008c) Multifunction of myricetin on A beta: neuroprotection via a conformational change of A beta and reduction of A beta via the interference of secretases. *J Neurosci Res* 86:368-377.
- Shimmyo Y, Kihara T, Akaike A, Niidome T, Sugimoto H (2008d) Three distinct neuroprotective functions of myricetin against glutamate-induced neuronal cell death: involvement of direct inhibition of caspase-3. *J Neurosci Res* 86:1836-1845.
- Shukitt-Hale B, Cheng V, Joseph JA (2009) Effects of blackberries on motor and cognitive function in aged rats. *Nutr Neurosci* 12:135-140.
- Simi A, Tsakiri N, Wang P, Rothwell NJ (2007) Interleukin-1 and inflammatory neurodegeneration. *Biochem Soc Trans* 35:1122-1126.
- Singh M, Arseneault M, Sanderson T, Murthy V, Ramassamy C (2008) Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. *J Agric Food Chem* 56:4855-4873.
- Sisodia SS, St George-Hyslop PH (2002) gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? *Nat Rev Neurosci* 3:281-290.
- Sithisarn P, Michaelis M, Schubert-Zsilavecz M, Cinatl J, Jr. (2012) Differential antiviral and anti-inflammatory mechanisms of the flavonoids biochanin A and baicalein in H5N1 influenza A virus-infected cells. *Antiviral Res* 97:41-48.
- Skovronsky DM, Moore DB, Milla ME, Doms RW, Lee VM (2000) Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-golgi network. *J Biol Chem* 275:2568-2575.
- Small BJ, Fratiglioni L, Viitanen M, Winblad B, Backman L (2000) The course of cognitive impairment in preclinical Alzheimer disease: three- and 6-year follow-up of a population-based sample. *Arch Neurol* 57:839-844.

- Soejima N, Ohyagi Y, Nakamura N, Himeno E, Iinuma KM, Sakae N, Yamasaki R, Tabira T, Murakami K, Irie K, Kinoshita N, LaFerla FM, Kiyohara Y, Iwaki T, Kira J (2013) Intracellular accumulation of toxic turn amyloid-beta is associated with endoplasmic reticulum stress in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 10:11-20.
- Sofroniew MV (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32:638-647.
- Sofroniew MV, Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:7-35.
- Solmaz S, Adan Gokbulut A, Cincin B, Ozdogu H, Boga C, Cakmakoglu B, Kozanoglu I, Baran Y (2014) Therapeutic potential of apigenin, a plant flavonoid, for imatinib-sensitive and resistant chronic myeloid leukemia cells. *Nutr Cancer* 66:599-612.
- Song F, Poljak A, Valenzuela M, Mayeux R, Smythe GA, Sachdev PS (2011) Meta-analysis of plasma amyloid-beta levels in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 26:365-375.
- Song W, Nadeau P, Yuan M, Yang X, Shen J, Yankner BA (1999) Proteolytic release and nuclear translocation of Notch-1 are induced by presenilin-1 and impaired by pathogenic presenilin-1 mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6959-6963.
- Sonker M, Yadav A Conformationally controlled mechanistic aspects of BACE 1 inhibitors (2012). *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 12:28-37.
- Soura V, Stewart-Parker M, Williams TL, Ratnayaka A, Atherton J, Gorringer K, Tuffin J, Darwent E, Rambaran R, Klein W, Lacor P, Staras K, Thorpe J, Serpell LC (2012) Visualization of co-localization in Abeta42-administered neuroblastoma cells reveals lysosome damage and autophagosome accumulation related to cell death. *Biochem J* 441:579-590.
- Spagnuolo C, Russo M, Bilotto S, Tedesco I, Laratta B, Russo GL (2012) Dietary polyphenols in cancer prevention: the example of the flavonoid quercetin in leukemia. *Ann N Y Acad Sci* 1259:95-103.
- Sparks DL (2011) Alzheimer disease: statins in the treatment of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 7:662-663.
- Spencer JP (2009a) The impact of flavonoids on memory: physiological and molecular considerations. *Chem Soc Rev* 38:1152-1161.
- Spencer JP (2009b) Flavonoids and brain health: multiple effects underpinned by common mechanisms. *Genes Nutr* 4:243-250.
- Spencer JP (2010) The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. *Br J Nutr* 104 Suppl 3:S40-47.
- Spencer JP, Vafeiadou K, Williams RJ, Vauzour D (2012) Neuroinflammation: modulation by flavonoids and mechanisms of action. *Mol Aspects Med* 33:83-97.
- Spilkova J, Hubik J (1992) [The biological actions of flavonoids. II]. *Pharm Unserer Zeit* 21:174-182.
- Spires-Jones TL, Kopeikina KJ, Koffie RM, de Calignon A, Hyman BT (2011) Are tangles as toxic as they look? *J Mol Neurosci* 45:438-444.
- Spoerri L, Vella LJ, Pham CL, Barnham KJ, Cappai R (2012) The amyloid precursor protein copper binding domain histidine residues 149 and 151 mediate APP stability and metabolism. *J Biol Chem* 287:26840-26853.
- Stangl D, Thuret S (2009) Impact of diet on adult hippocampal neurogenesis. *Genes Nutr* 4:271-282.
- Stefani M, Rigacci S (2014) Beneficial properties of natural phenols: Highlight on protection against pathological conditions associated with amyloid aggregation. *Biofactors*.
- Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR (1995) An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat* 8:429-431.
- Strickland E, Hakala K, Thomas PJ, DeMartino GN (2000) Recognition of misfolding proteins by PA700, the regulatory subcomplex of the 26 S proteasome. *J Biol Chem* 275:5565-5572.
- Su B, Wang X, Nunomura A, Moreira PI, Lee HG, Perry G, Smith MA, Zhu X (2008) Oxidative stress signaling in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 5:525-532.
- Sultana R, Butterfield DA (2009) Oxidatively modified, mitochondria-relevant brain proteins in subjects with Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *J Bioenerg Biomembr* 41:441-446.

- Sun AY, Chen YM, James-Kracke M, Wixom P, Cheng Y (1997) Ethanol-induced cell death by lipid peroxidation in PC12 cells. *Neurochem Res* 22:1187-1192.
- Sun L, Zhang J, Lu X, Zhang L, Zhang Y (2011) Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. *Food Chem Toxicol* 49:2689-2696.
- Supnet C, Bezprozvanny I (2010) Neuronal calcium signaling, mitochondrial dysfunction, and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 20 Suppl 2:S487-498.
- Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L, Jr., Eckman C, Golde TE, Younkin SG (1994) An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* 264:1336-1340.
- Tai HC, Serrano-Pozo A, Hashimoto T, Frosch MP, Spires-Jones TL, Hyman BT (2012) The synaptic accumulation of hyperphosphorylated tau oligomers in Alzheimer disease is associated with dysfunction of the ubiquitin-proteasome system. *Am J Pathol* 181:1426-1435.
- Takahashi RH, Nam EE, Edgar M, Gouras GK (2002) Alzheimer beta-amyloid peptides: normal and abnormal localization. *Histol Histopathol* 17:239-246.
- Tanabe C, Hotoda N, Sasagawa N, Sehara-Fujisawa A, Maruyama K, Ishiura S (2007) ADAM19 is tightly associated with constitutive Alzheimer's disease APP alpha-secretase in A172 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 352:111-117.
- Taniguchi S, Suzuki N, Masuda M, Hisanaga S, Iwatsubo T, Goedert M, Hasegawa M (2005) Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins. *J Biol Chem* 280:7614-7623.
- Tapiola T, Alafuzoff I, Herukka SK, Parkkinen L, Hartikainen P, Soininen H, Pirttilä T (2009) Cerebrospinal fluid {beta}-amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain. *Arch Neurol* 66:382-389.
- Thibault O, Gant JC, Landfield PW (2007) Expansion of the calcium hypothesis of brain aging and Alzheimer's disease: minding the store. *Aging Cell* 6:307-317.
- Tiiman A, Palumaa P, Tougu V The missing link in the amyloid cascade of Alzheimer's disease - metal ions. *Neurochem Int* 62:367-378.
- Tong G, Wang JS, Sverdlov O, Huang SP, Slemmon R, Croop R, Castaneda L, Gu H, Wong O, Li H, Berman RM, Smith C, Albright CF, Dockens R (2013) A contrast in safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics across age groups after a single 50 mg oral dose of the gamma-secretase inhibitor avagacestat. *Br J Clin Pharmacol* 75:136-145.
- Tong Y, Zhou W, Fung V, Christensen MA, Qing H, Sun X, Song W (2005) Oxidative stress potentiates BACE gene expression and Abeta generation. *J Neural Transm* 112:455-469.
- Torres LL, Quaglio NB, de Souza GT, Garcia RT, Dati LM, Moreira WL, Loureiro AP, de Souza-Talarico JN, Smid J, Porto CS, Bottino CM, Nitrini R, Barros SB, Camarini R, Marcourakis T (2011) Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 26:59-68.
- Tota S, Awasthi H, Kamat PK, Nath C, Hanif K (2010) Protective effect of quercetin against intracerebral streptozotocin induced reduction in cerebral blood flow and impairment of memory in mice. *Behav Brain Res* 209:73-79.
- Toyama H, Ichise M, Liow JS, Modell KJ, Vines DC, Esaki T, Cook M, Seidel J, Sokoloff L, Green MV, Innis RB (2004) Absolute quantification of regional cerebral glucose utilization in mice by 18F-FDG small animal PET scanning and 2-14C-DG autoradiography. *J Nucl Med* 45:1398-1405.
- Trippier PC, Zhao KT, Fox SG, Schiefer IT, Benmohamed R, Moran J, Kirsch DR, Morimoto RI, Silverman RB (2014) Proteasome Activation is a Mechanism for Pyrazolone Small Molecules Displaying Therapeutic Potential in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *ACS Chem Neurosci*.
- Tsang AH, Chung KK (2009) Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1792:643-650.
- Turrin NP, Plata-Salaman CR (2000) Cytokine-cytokine interactions and the brain. *Brain Res Bull* 51:3-9.

- Ullrich O, Reinheckel T, Sitte N, Hass R, Grune T, Davies KJ (1999) Poly-ADP ribose polymerase activates nuclear proteasome to degrade oxidatively damaged histones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6223-6228.
- Ulrich HD (2002) Natural substrates of the proteasome and their recognition by the ubiquitin system. *Curr Top Microbiol Immunol* 268:137-174.
- Uydes-Dogan BS, Takir S, Ozdemir O, Kolak U, Topcu G, Ulubelen A (2005) The comparison of the relaxant effects of two methoxylated flavones in rat aortic rings. *Vascul Pharmacol* 43:220-226.
- Vafeiadou K, Vauzour D, Spencer JP (2007) Neuroinflammation and its modulation by flavonoids. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 7:211-224.
- Valla J, Chen K, Berndt JD, Gonzalez-Lima F, Cherry SR, Games D, Reiman EM (2002) Effects of image resolution on autoradiographic measurements of posterior cingulate activity in PDAPP mice: implications for functional brain imaging studies of transgenic mouse models of Alzheimer's Disease. *Neuroimage* 16:1-6.
- Van Gassen G, Annaert W (2003) Amyloid, presenilins, and Alzheimer's disease. *Neuroscientist* 9:117-126.
- Vargas AJ, Burd R (2010) Hormesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management. *Nutr Rev* 68:418-428.
- Vauzour D (2014) Effect of flavonoids on learning, memory and neurocognitive performance: relevance and potential implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *J Sci Food Agric* 94:1042-1056.
- Vauzour D, Vafeiadou K, Rice-Evans C, Williams RJ, Spencer JP (2007) Activation of pro-survival Akt and ERK1/2 signalling pathways underlie the anti-apoptotic effects of flavanones in cortical neurons. *J Neurochem* 103:1355-1367.
- Vepsalainen S, Koivisto H, Pekkarinen E, Makinen P, Dobson G, McDougall GJ, Stewart D, Haapasalo A, Karjalainen RO, Tanila H, Hiltunen M (2012) Anthocyanin-enriched bilberry and blackcurrant extracts modulate amyloid precursor protein processing and alleviate behavioral abnormalities in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem* 24:360-370.
- Vepsalainen S, Koivisto H, Pekkarinen E, Makinen P, Dobson G, McDougall GJ, Stewart D, Haapasalo A, Karjalainen RO, Tanila H, Hiltunen M (2013) Anthocyanin-enriched bilberry and blackcurrant extracts modulate amyloid precursor protein processing and alleviate behavioral abnormalities in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem* 24:360-370.
- Vetrivel KS, Zhang YW, Xu H, Thinakaran G (2006) Pathological and physiological functions of presenilins. *Mol Neurodegener* 1:4.
- Vilalta-Franch J, Lopez-Pousa S, Llinas-Regla J, Calvo-Perxas L, Merino-Aguado J, Garre-Olmo J (2012) Depression subtypes and 5-year risk of dementia and Alzheimer disease in patients aged 70 years. *Int J Geriatr Psychiatry* 28:341-350.
- Villarroya M, Garcia AG, Marco-Contelles J, Lopez MG (2007) An update on the pharmacology of galantamine. *Expert Opin Investig Drugs* 16:1987-1998.
- Villemagne VL, Fodero-Tavoletti MT, Pike KE, Cappai R, Masters CL, Rowe CC (2008) The ART of loss: Abeta imaging in the evaluation of Alzheimer's disease and other dementias. *Mol Neurobiol* 38:1-15.
- Vito P, Wolozin B, Ganjei JK, Iwasaki K, Lacana E, D'Adamio L (1996) Requirement of the familial Alzheimer's disease gene PS2 for apoptosis. Opposing effect of ALG-3. *J Biol Chem* 271:31025-31028.
- Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269:5241-5248.
- Vural H, Demirin H, Kara Y, Eren I, Delibas N (2010) Alterations of plasma magnesium, copper, zinc, iron and selenium concentrations and some related erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with Alzheimer's disease. *J Trace Elem Med Biol* 24:169-173.

- Walter J, Grunberg J, Capell A, Pesold B, Schindzielorz A, Citron M, Mendla K, George-Hyslop PS, Multhaup G, Selkoe DJ, Haass C (1997) Proteolytic processing of the Alzheimer disease-associated presenilin-1 generates an in vivo substrate for protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5349-5354.
- Walter J, Grunberg J, Schindzielorz A, Haass C (1998) Proteolytic fragments of the Alzheimer's disease associated presenilins-1 and -2 are phosphorylated in vivo by distinct cellular mechanisms. *Biochemistry* 37:5961-5967.
- Walter J, Schindzielorz A, Grunberg J, Haass C (1999) Phosphorylation of presenilin-2 regulates its cleavage by caspases and retards progression of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1391-1396.
- Wang C, Youle RJ (2009) The role of mitochondria in apoptosis*. *Annu Rev Genet* 43:95-118.
- Wang CJ, Chen CC, Tsay HJ, Chiang FY, Wu MF, Shiao YJ (2013a) *Cudrania cochinchinensis* attenuates amyloid beta protein-mediated microglial activation and promotes glia-related clearance of amyloid beta protein. *J Biomed Sci* 20:55.
- Wang G, Song L, Wang H, Xing N (2013b) Quercetin synergizes with 2-methoxyestradiol inhibiting cell growth and inducing apoptosis in human prostate cancer cells. *Oncol Rep* 30:357-363.
- Wang J, Ho L, Zhao W, Ono K, Rosensweig C, Chen L, Humala N, Teplow DB, Pasinetti GM (2008) Grape-derived polyphenolics prevent A β oligomerization and attenuate cognitive deterioration in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 28:6388-6392.
- Wang J, Santa-Maria I, Ho L, Ksiezak-Reding H, Ono K, Teplow DB, Pasinetti GM (2010a) Grape derived polyphenols attenuate tau neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 22:653-661.
- Wang LE, Cui XY, Cui SY, Cao JX, Zhang J, Zhang YH, Zhang QY, Bai YJ, Zhao YY (2010b) Potentiating effect of spinosin, a C-glycoside flavonoid of *Semen Ziziphi spinosae*, on pentobarbital-induced sleep may be related to postsynaptic 5-HT(1A) receptors. *Phytomedicine* 17:404-409.
- Wang Y, Wang L, Wu J, Cai J (2006) The in vivo synaptic plasticity mechanism of EGb 761-induced enhancement of spatial learning and memory in aged rats. *Br J Pharmacol* 148:147-153.
- Weiner MW, Veitch DP, Aisen PS, Beckett LA, Cairns NJ, Green RC, Harvey D, Jack CR, Jagust W, Liu E, Morris JC, Petersen RC, Saykin AJ, Schmidt ME, Shaw L, Siuciak JA, Soares H, Toga AW, Trojanowski JQ (2012) The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: a review of papers published since its inception. *Alzheimers Dement* 8:S1-68.
- Weisman D, Hakimian E, Ho GJ (2006) Interleukins, inflammation, and mechanisms of Alzheimer's disease. *Vitam Horm* 74:505-530.
- Wellington CL, Hayden MR (1997) Of molecular interactions, mice and mechanisms: new insights into Huntington's disease. *Curr Opin Neurol* 10:291-298.
- Wieland HA, Luddens H, Seeburg PH (1992) A single histidine in GABA A receptors is essential for benzodiazepine agonist binding. *J Biol Chem* 267:1426-1429.
- Wild AC, Mulcahy RT (2000) Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression: insights into transcriptional control of antioxidant defenses. *Free Radic Res* 32:281-301.
- Williams RJ, Spencer JP (2012) Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 52:35-45.
- Wolfe MS (2007) When loss is gain: reduced presenilin proteolytic function leads to increased A β 42/A β 40. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease. *EMBO Rep* 8:136-140.
- Wolfe MS (2012) gamma-Secretase inhibitors and modulators for Alzheimer's disease. *J Neurochem* 120 Suppl 1:89-98.
- Wolfe MS, Xia W, Moore CL, Leatherwood DD, Ostaszewski B, Rahmati T, Donkor IO, Selkoe DJ (1999) Peptidomimetic probes and molecular modeling suggest that Alzheimer's gamma-secretase is an intramembrane-cleaving aspartyl protease. *Biochemistry* 38:4720-4727.

- Wolfman C, Viola H, Marder M, Wasowski C, Ardenghi P, Izquierdo I, Paladini AC, Medina JH (1996) Anxiolytic properties of 6,3'-dinitroflavone, a high-affinity benzodiazepine receptor ligand. *Eur J Pharmacol* 318:23-30.
- Wolozin B, Iwasaki K, Vito P, Ganjei JK, Lacana E, Sunderland T, Zhao B, Kusiak JW, Wasco W, D'Adamio L (1996) Participation of presenilin 2 in apoptosis: enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation. *Science* 274:1710-1713.
- Wyss DF, Wang YS, Eaton HL, Strickland C, Voigt JH, Zhu Z, Stamford AW. (2011) Combining NMR and X-ray crystallography in fragment-based drug discovery: discovery of highly potent and selective BACE-1 inhibitors. *Top Curr Chem* 317:83-114.
- Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, Silverstein SC, Husemann J (2003) Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med* 9:453-457.
- Xiao ZP, Wang XD, Peng ZY, Huang S, Yang P, Li QS, Zhou LH, Hu XJ, Wu LJ, Zhou Y, Zhu HL (2013) Molecular docking, kinetics study, and structure-activity relationship analysis of quercetin and its analogous as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. *J Agric Food Chem* 60:10572-10577.
- Xie H, Wang JR, Yau LF, Liu Y, Liu L, Han QB, Zhao Z, Jiang ZH (2014) Quantitative analysis of the flavonoid glycosides and terpene trilactones in the extract of *Ginkgo biloba* and evaluation of their inhibitory activity towards fibril formation of beta-amyloid peptide. *Molecules* 19:4466-4478.
- Yang MC, Lung FW (2011) Neuroprotection of paliperidone on SH-SY5Y cells against beta-amyloid peptide (25-35), N-methyl-4-phenylpyridinium ion, and hydrogen peroxide-induced cell death. *Psychopharmacology (Berl)* 217:397-410.
- Yang SG, Wang WY, Ling TJ, Feng Y, Du XT, Zhang X, Sun XX, Zhao M, Xue D, Yang Y, Liu RT. (2010a) Alpha-Tocopherol quinone inhibits beta-amyloid aggregation and cytotoxicity, disaggregates preformed fibrils and decreases the production of reactive oxygen species, NO and inflammatory cytokines. *Neurochem Int* 57:914-922.
- Yang SG, Zhang X, Sun XS, Ling TJ, Feng Y, Du XY, Zhao M, Yang Y, Xue D, Wang L, Liu RT (2010b) Diverse ecdysterones show different effects on amyloid-beta42 aggregation but all uniformly inhibit amyloid-beta42-induced cytotoxicity. *J Alzheimers Dis* 22:107-117.
- Yao J, Brinton RD (2011) Targeting mitochondrial bioenergetics for Alzheimer's prevention and treatment. *Curr Pharm Des* 17:3474-3479.
- Yi LT, Li JM, Li YC, Pan Y, Xu Q, Kong LD (2008) Antidepressant-like behavioral and neurochemical effects of the citrus-associated chemical apigenin. *Life Sci* 82:741-751.
- Yu JT, Chang RC, Tan L (2009) Calcium dysregulation in Alzheimer's disease: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Prog Neurobiol* 89:240-255.
- Zandi K, Teoh BT, Sam SS, Wong PF, Mustafa MR, Abubakar S (2013) Novel antiviral activity of baicalein against dengue virus. *BMC Complement Altern Med* 12:214.
- Zhai X, Lin M, Zhang F, Hu Y, Xu X, Li Y, Liu K, Ma X, Tian X, Yao J (2013) Dietary flavonoid genistein induces Nrf2 and phase II detoxification gene expression via ERKs and PKC pathways and protects against oxidative stress in Caco-2 cells. *Mol Nutr Food Res* 57:249-259.
- Zhang H, Ma Q, Zhang YW, Xu H (2012) Proteolytic processing of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *J Neurochem* 120 Suppl 1:9-21.
- Zhang L, Cao H, Wen J, Xu M (2009) Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate enhances the inhibitory effect of huperzine A on acetylcholinesterase by increasing the affinity with serum albumin. *Nutr Neurosci* 12:142-148.
- Zhang L, Shen C, Chu J, Zhang R, Li Y, Li L (2014) Icaritin decreases the expression of APP and BACE-1 and reduces the beta-amyloid burden in an APP transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Int J Biol Sci* 10:181-191.
- Zhang YC, Gan FF, Shelar SB, Ng KY, Chew EH (2013) Antioxidant and Nrf2 inducing activities of luteolin, a flavonoid constituent in *Ixeris sonchifolia* Hance, provide neuroprotective effects against ischemia-induced cellular injury. *Food Chem Toxicol* 59:272-280.
- Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H (2011) APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain* 4:3.

- Zhao C, Deng W, Gage FH (2008) Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132:645-660.
- Zhao X, Yang J (2010) Amyloid-beta peptide is a substrate of the human 20S proteasome. *ACS Chem Neurosci* 1:655-660.
- Zhou S, Zhou H, Walian PJ, Jap BK (2006a) The discovery and role of CD147 as a subunit of gamma-secretase complex. *Drug News Perspect* 19:133-138.
- Zhou XM, Yao H, Xia ML, Cao CM, Jiang HD, Xia Q (2006b) [Comparison of vasodilatation effect between quercetin and rutin in the isolated rat thoracic aorta]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 35:29-33.